

**Leistungsfähigkeit von
MEKC-Methoden
und
chiralen Trennungen mittels Kapillarelektrophorese**

Entwicklung, Validierung und Anwendung kapillarelektrophoretischer
Methoden

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig



zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation

von

Phillip Eckehard Diederich Hasemann

aus Osnabrück

1. Referent: Professor Dr. Hermann Wätzig

2. Referent: Professor Dr. Knut Baumann

eingereicht am: 06.10.2010

mündliche Prüfung (Disputation) am: 04.03.2011

Druckjahr 2011

Veröffentlichungen

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

El Deeb, S.; Hasemann, P.; Wätzig, H.: Strategies in method development to quantify enantiomeric impurities using CE. *Electrophoresis* (2008), 29(17), 3552-3562.

Hasemann, P.; ter Balk, M.; Wätzig, H.: Analysis of substances to be used as internal standards in MEKC. *Electrophoresis* (2007), 28(11), 1798-1804.

Hasemann P.; ter Balk M.; Preu L.; Wätzig H.: Separation of cold medicine ingredients using a precise MEKC method at elevated pH. *Electrophoresis* (2007), 28(11), 1779-87.

Tagungsbeiträge

El Deeb, S., Hasemann, P., Wätzig, H. Challenges in Method Development for Enantiomeric Impurity Determination Using Capillary Electrophoresis (Oral Presentation) DPhG Meeting, Erlangen, 10-15 Germany, October (2007).

El Deeb, S., Hasemann, P., Wätzig, H. Challenges in Method Development for Enantiomeric Impurity Determination Using Capillary Electrophoresis (Oral Presentation) 12th International Meeting on Recent Developments in Pharmaceutical Analysis (RDPA 2007) - Hotel Hermitage- Island of Elba, Italy, September 23-26, 2007.

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von April 2004 bis August 2007 am Institut für Pharmazeutische Chemie der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig unter Anleitung von

Herrn Professor Dr. Hermann Wätzig,

dem ich an dieser Stelle für die Überlassung der interessanten Aufgabenstellung, die ausdauernde und engagierte Betreuung, intensive und uneingeschränkte Unterstützung zu allen Zeiten, die ständige Diskussionsbereitschaft und das entgegengebrachte Vertrauen herzlich danken möchte.

Mein besonderer Dank gilt auch

Herrn Professor Dr. Knut Baumann

für die Übernahme des Koreferats.



„Ein Optimist ist jemand, der genau weiß, wie traurig die Welt sein kann,
während ein Pessimist täglich neu zu dieser Erkenntnis gelangt.“

Peter Ustinov

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Aufgabenstellung	1
2	Kapillarelektrophorese	3
2.1	Grundlagen der Kapillarelektrophorese (CE)	3
2.1.1	Geräteaufbau	4
2.1.1.1	Kapillaren	5
2.1.1.2	Detektion	7
2.1.2	Injektion	10
2.2	Theoretische Grundlagen	15
2.2.1	Elektrophoretische Mobilität	15
2.2.2	Elektroosmotischer Fluss (EOF)	18
2.2.3	Trennprinzip	24
2.3	Mizellare Elektrokinetische Chromatographie (MEKC)	26
2.4	Enantiomerentrennung mittels Kapillarelektrophorese	28
2.4.1	Einleitung	28
2.4.2	Trennprinzip	34
2.4.3	Chirale Selektoren	38
2.4.3.1	Cyclodextrine	39
2.4.3.2	Kronenether	47
2.4.3.3	Lineare Oligo- und Polysaccharide	47
2.4.3.4	Makrozyklische Antibiotika	48
2.4.3.5	Andere Chirale Selektoren	49
3	Methodenvalidierung	51

4	Verwendung Interner Standards in der MEKC	54
4.1	Allgemeine Grundlagen	54
4.2	Anforderungen an Interne Standards	55
4.3	Verbesserung der Leistungsmerkmale von CE-Methoden durch Verwendung von Internen Standards	56
4.4	Unterschiede zwischen den Bedingungen in der CZE und MEKC	57
4.5	Untersuchung von Substanzen zum Einsatz als Interne Standards in der MEKC	58
4.5.1	Einleitung	58
4.5.2	Auswahl der Substanzen	60
4.5.3	Berechnung des Kapazitätsfaktors	61
4.6	Ergebnisse und Zusammenfassung	64
4.6.1	Anwendungsbeispiele	71
4.6.1.1	Geräte- und Performance-Test	72
4.6.1.2	Trennung der Inhaltsstoffe des Erkältungssaftes Wick MediNait™	75
5	Trennung der Inhaltsstoffe des Erkältungssaftes Wick MediNait™	76
5.1	Einleitung	76
5.2	Zusammensetzung des Erkältungssaftes Wick MediNait™	77
5.3	Matrix – Kapillarwandinteraktionen	79
5.4	Methodenentwicklung	79
5.4.1	Puffer	81
5.4.1.1	Puffertyp und Einfluss der Puffermolarität	81
5.4.1.2	Einfluss des Puffer pH-Wertes	83
5.4.1.3	Einfluss der SDS-Konzentration	88

5.4.1.4 Einfluss der Methanol-Konzentration	89
5.4.2 Spülprozedur zwischen den Analysenläufen	91
5.5 Methodenvalidierung	91
5.5.1 Selektivität	91
5.5.2 Präzision	92
5.5.3 Robustheit	96
5.6 Zusammenfassung	96
6 Bestimmung der enantiomeren Verunreinigungen	97
6.1 Einleitung	97
6.1.1 Chirale Arzneistoffe – Pharmakokinetik und Pharmakodynamik	97
6.1.2 Methodenvergleich	98
6.1.3 Methoden zur chiralen Trennung mittels CE	99
6.1.4 Strategien in der Methodenentwicklung	100
6.1.5 Anforderungen gemäß ICH-Qualitäts-Guidelines [67]	101
6.2 Screening	102
6.2.1 Auswahl der chiralen Selektoren	102
6.2.2 Auswahl der Methodenparameter und Durchführung des Screenings	103
6.2.3 Ergebnisse des Screenings	106
6.3 Optimierung	109
6.3.1 Ziel der Optimierung [132]	109
6.3.2 Abfolge der Methodenentwicklung:	110
6.3.3 Variation des Puffer <i>pH</i> – Wertes	110
6.3.4 Cyclodextrin – Konzentration	111

6.3.5	Zusatz von organischen Lösungsmitteln	111
6.3.6	Methodenoptimierung zur Trennung basischer Enantiomerenpaare	112
6.3.7	Methodenoptimierung zur Trennung saurer Enantiomerenpaare	116
6.4	Enantiomeren Bestimmung	118
6.4.1	Überladung durch Volumenerhöhung	118
6.4.2	Berechnung der gemessenen und der erforderlichen Auflösung	121
6.4.3	Berechnung der Bestimmungsgrenze (QL)	124
6.4.4	Präzisionsdaten	127
6.4.5	Zusammenfassung	127
7	Zusammenfassung	129
8	Experimenteller Teil	132
8.1	Instrumentierung	132
8.1.1	Kapillarelektrophoresegeräte	132
8.1.2	UV-Spektrometer	133
8.1.3	Allgemeine Geräte	133
8.2	Software	134
8.3	Kapillaren	135
8.4	Reagenzien und Chemikalien	136
8.5	Lösungen und Puffer	143
8.5.1	Lösungen und Puffer für IS-Experimente (4)	143
8.5.1.1	Borat-Puffer 50 mM (pH 8,5)	144
8.5.1.2	Borat-Puffer 50 mM (pH 8,5) mit MeOH-Zusatz (3,95 g / 100ml)	144
8.5.1.3	Borat-Puffer mit SDS Zusatz (50 mM)	144

8.5.1.4 Probenlösungen	144
8.5.2 Lösungen und Puffer für die MEKC-Experimente zur Trennung der Inhaltsstoffe im Erkältungssaft	145
8.5.2.1 Borat-Puffer 10 mM (pH 10; 7,5 % MeOH, 150 mM SDS)	145
8.5.2.2 Probenlösungen	145
8.5.2.3 Referenzlösungen	146
8.5.3 Lösungen und Puffer für die Bestimmung der enantiomeren Verunreinigungen	146
8.5.3.1 Pufferlösungen	146
8.5.3.2 Probenlösungen	146
8.5.3.3 Cyclodextrin-Zusatz zum Trennpuffer	147
8.5.4 Lösungen für die HPLC-Messungen	147
8.5.4.1 Herstellung der Mobilen Phase	147
8.5.4.2 Herstellung der Probenlösungen	147
9 Literaturverzeichnis	148
10 Anhänge	158
10.1 Glossar zur Methodenvvalidierung gemäß ICH [67]	158
10.2 Aspekte einer Risikoanalyse zur Validierung von CE-Methoden	161
10.3 UV-Spektrenset der untersuchten IS-Substanzen	163
10.4 Testplan zur Untersuchung der Stabilität von Cyclodextrinen	175
10.5 UV-Spektren des Trennpuffers ohne und mit SDS-Zusatz (250 mM)	177

Abkürzungen

Abs. Max.	Absorptionsmaximum (UV)
API	Wirkstoff (Active Pharmaceutical Ingredient)
BGE	Hintergrundelektrolyt (Background electrolyte)
CD	Cyclodextrin
CE	Kapillarelektrophorese (Capillary electrophoresis)
CEC	Elektrochromatographie (Capillary electrochromatography)
CGE	Kapillargelelektrophorese (Capillary gel electrophoresis)
CIEF	Kapillarisoelektrische Fokussierung (capillary isoelectric focussing)
C _{max}	Maximale Konzentration
CMC	Kritische mizellare Konzentration
CSP	Chirale stationäre Phasen (Chiral stationary phases)
CZE	Kapillarzonenelektrophorese (Capillary zone electrophoresis)
DL	Nachweisgrenze (Detection Limit)
DMF	N,N-Dimethylformamid
DS	Durchschnittlicher Substitutionsgrad (Degree of substitution)
EOF	Elektroosmotischer (oder endoosmotischer) Fluss
GC	Gas-Chromatographie
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie (High Performance Liquid Chromatography)
HS-CD	Hochsulfatiertes Cyclodextrin
I.D.	Innendurchmesser (inner diameter)
i.H.p.	Innere Helmholtz-Schicht (inner Helmholtz plane)

IS8	Mischprobe aus 8 Internen Standardsubstanzen
ITP	Isotachophorese
Konz.	Konzentration
LPA	Polyacrylamid
MEKC	Mizellare Elektrokinetische Chromatographie (siehe 2.3)
MeOH	Methanol
min	Minute(n)
O.D.	Außendurchmesser (outer diameter)
o.H.p.	Helmholtz-Schicht (outer Helmholtz plane)
QA-CD	Quartäres Cyclodextrin
QL	Bestimmungsgrenze (Quantivication Limit)
QL%	Quantivication Limit (Bestimmungsgrenze) in Prozent
RSD%	Relative Standardabweichung in Prozent
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde(n)
SFC	Überkritische Flüssigchromatographie
SST	Systemfunktionstest
S/N	Signal-Rausch Verhältnis (signal to noise ratio)

Symbole

AU_{abs}	Peakfläche
AU_{korr}	korrigierte Peakfläche
AU_{rel}	relative Peakfläche (bezogen auf den Internen Standard)
d	Durchmesser [μm]
Δh	Höhendifferenz des Kapillarein- und austrittsendes
Δp	Injektionsdruck [mbar]
E	elektrische Feldstärke [$\text{V} \cdot \text{m}^{-1}$]
e_0	Elementarladung [$1,602 \cdot 10^{-19} \text{ A} \cdot \text{s}$]
η	dynamische Viskosität [$\text{N} \cdot \text{s} \cdot \text{cm}^{-1}$]
F_e	elektrische Kraft [N]
F_R	Reibungskraft [N]
l_{det}	effektive Kapillarlänge [cm]
l_{ges}	gesamte Kapillarlänge [cm]
K	Verteilungskoeffizienten zw. wässriger und mizellarer Phase
k_S	Kapazitätsfaktor
n	Theoretische Trennstufenzahl
n_{mc}	Stoffmenge, die von der Mizelle eingeschlossen ist
n_{aq}	Stoffmenge, die sich in der wässrigen Phase befindet
v_d	experimentell erhaltene Migrationsgeschwindigkeit
v_{EOF}	Wanderungsgeschwindigkeit elektrisch neutraler Teilchen
v_i	Migrationsgeschwindigkeit der Teilchen (i) [$\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$]

μ_{eff}	effektive elektrophoretische Mobilität
μ_{EOF}	elektrophoretische Mobilität elektrisch neutraler Teilchen
μ_i	(absolute) elektrophoretische Mobilität
π	Kreiszahl (pi); ihr numerischer Wert: $\pi = 3,14159\dots$
pH-Wert	Negative dekadische Logarithmus der H_3O^+ -Aktivität (p otentia H ydrogenii (lat.: potentia, f. = Kraft; hydrogenium, n. = Wasserstoff))
pK_s	Negative dekadische Logarithmus der Säurekonstanten (K_s)
Q_{eff}	Effektive Ladungszahl der Teilchen (i) [$\text{A} \cdot \text{s}$]
R_{eff}	Teilchenradius in wässriger Lösung (Solvathülle)
r_i	Radius der Teilchen (i)
t	Injektionszeit [s]
$\Delta t_{\text{M-me}}$	Differenz zwischen der Migrationszeit des Peaks der Hauptkomponente und Verunreinigung (Enantiomerentrennung)
$\Delta t_{\text{M-re}}$	Differenz der Migrationszeiten (Racemisches Gemisch)
$t_{\text{M-sh}}$	Berechnete Peakverschiebung (Enantiomerentrennung)
t_R	Migrationszeit
t_0	Migrationszeit neutraler Teilchen; EOF-Marker
t_{mc}	Migrationszeit der Mizellen
U	Spannung [V]
X_{logP}	Partitions-Koeffizient (Verteilung zwischen polarer und unpolarer Phase)
z_i	Anzahl der Ladungen pro Teilchen (i)

1 Einleitung und Aufgabenstellung

Der Konkurrenz- und Preiskampf, geschürt durch regulatorische Eingriffe in den Arzneimittelmarkt, verlangt von forschenden Arzneimittelherstellern hohe Produktivität und Wirtschaftlichkeit auch in der Entwicklungsphase neuer innovativer Arzneimittel. So erfordert die hohe Anzahl an Wirkstoffkandidaten (High Throughput Technologies) präzise Screeningverfahren und strukturierte Screening-Strategien. In der darauf folgenden Entwicklung und Charakterisierung von Wirkstoffen und Formulierungen sind selektive, empfindliche und robuste Methoden zur Beschreibung und Datenerhebung Grundvoraussetzungen zur Arbeit im analytischen Entwicklungslabor. Im weiteren Lebenszyklus sind schnelle und leistungsstarke Analysemethoden für die Freigabe- und Routineanalytik von Arzneimitteln Standardanforderungen, um validierte Vorgaben für Spezifikationen definieren zu können und in der Folge zu prüfen, ob die Qualität jeder einzelnen, hergestellten Charge sichergestellt werden kann. Unter den aktuellen wirtschaftlichen Voraussetzungen können die hohen Qualitätsansprüche an die moderne Analytik nur mit schnellen und kostensparenden Methodenentwicklungsstrategien erreicht werden.

Neue Targets für die Arzneistoffentwicklung und neue Impulse aus der Aufklärung molekularer Eigenschaften unterstreichen, wie wichtig empfindliche und spezifische Analyseverfahren und darüber hinaus effektive Entwicklungsstrategien für die Qualitätskontrolle sind.

Die Kapillarelektrophorese ist eine der leistungsfähigsten Trenntechniken, die in der Qualitätskontrolle zur Anwendung kommen. Neben der Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) und der Gaschromatographie (GC) hat sie sich in den 25 Jahren seit ihrer Einführung zu einem leistungsstarken Verfahren in der instrumentellen Analytik entwickelt. Dabei deckt die Kapillarelektrophorese ein sehr breites Spektrum an Einsatzmöglichkeiten zur Lösung analytische Trennprobleme ab. Das spiegelt sich auch in den Einsatzgebieten der analytischen Trennmethode und Entwicklungsstrategien dieser Arbeit wieder. Es wurde die Methodenentwicklung für Anwendungen im Bereich der Enantiomerentrennung mittels Kapillarelektrophorese ebenso behandelt wie für den Einsatz der Mizellaren Elektrokinetischen Chromatographie (MEKC).

Im Einzelnen sollten dabei folgende Fragestellungen behandelt werden:

- Anforderungen an die Validierung von analytischen Methoden in der Kapillarelektrophorese
- Verwendung von Standardsubstanzen in der MEKC
 - Möglichkeit zur Erhöhung der Leistungsfähigkeit von MEKC-Methoden
 - Gezielte Auswahl von Verbindungen als Standardsubstanzen vor dem Hintergrund des jeweiligen analytische Trennproblems
- Ersatz aufwendiger und zeitintensiver HPLC-Methoden zur Bestimmung von Vielstoffgemischen durch eine leistungsstarke CE-Methode
- Bestimmung von enantiomeren Verunreinigungen
 - Anforderungen an eine zielgerichtete Methodenentwicklung
 - Leistungsparameter kapillarelektrophoretischer Bestimmungsmethoden mit chiralen Selektoren

Im Rahmen der einzelnen Fragestellungen der vorliegenden Arbeit sollte durch Anwendungsbeispiele der praktische Nutzen der erarbeiteten Ergebnisse und Strategien belegt und das Potential dieser analytischen Verfahren aufgezeigt werden.

2 Kapillarelektrophorese

2.1 Grundlagen der Kapillarelektrophorese (CE)

Elektrophorese ist die Wanderung (Migration) von geladenen Teilchen im elektrischen Feld. Die unterschiedlichen Wanderungsrichtungen und/oder -geschwindigkeiten ergeben Trennungseffekte, die sich analytisch (und präparativ) auswerten lassen. Um eine Gliederung der verschiedenen elektrophoretischen Verfahren vornehmen zu können, werden unterschiedliche Klassifizierungskriterien herangezogen: Trennmedium, Elektrolytverteilung im Trennmedium, Trägermaterial, Trennprinzip, Anordnung und Gestalt des Trennmediums. Diese zeigen bereits die vielfältigen Trennmöglichkeiten elektrophoretischer Verfahren auf.

Die Kapillarelektrophorese vereint die hohe Trennleistung und Selektivität klassischer elektrophoretischer Verfahren mit den instrumentellen Fortschritten chromatographischer Methoden. Der Einsatz von Probenwechslern, direkter Detektion der getrennten Probe in der Kapillare und die Anbindung an EDV-gestützte Systeme erlauben die automatisierte Steuerung und Auswertung der einzelnen Messungen. Dadurch besitzt die CE eine deutlich bessere Reproduzierbarkeit und eine höhere Präzision als beispielsweise die klassische Gelelektrophorese. Durch den einfachen Geräteaufbau (2.1.1) und die weniger aufwendige Probenvorbereitung lässt sich außerdem der Probendurchsatz deutlich steigern und gleichzeitig der manuelle Aufwand reduzieren.

Gemäß der Klassifizierung nach Anordnung und Gestalt des Trennmediums werden unter dem Begriff Kapillarelektrophorese alle Trennverfahren zusammengefasst, die in zylindrischen Trennkompartmenten durchgeführt werden. Die Gegenüberstellung der wichtigsten CE-Techniken zeigt, dass in der CE verschiedene elektrophoretische Trennprinzipien umgesetzt werden können. Bei der Kapillarzonenelektrophorese (CZE) ist die gesamte Kapillare mit einem einheitlichen Elektrolyten gefüllt (trägerfrei). Weitere wichtige Verfahren sind die Mizellare Elektrokinetische Chromatographie (MEKC; 2.3) und die Kapillargelelektrophorese (CGE), bei der die Kapillare mit einer Polymerlösung oder einem Gel gefüllt ist. Bei der Kapillarisoelektrische Fokussierung (CIEF) erfolgt die Trennung entlang eines pH-

Gradienten. In der Isotachophorese (ITP) wird ein diskontinuierliches Elektrolytssystem verwendet [1].

2.1.1 Geräteaufbau

Eine schematische Zeichnung einer CE-Apparatur ist in Abbildung 1 dargestellt. Die wichtigsten Bestandteile sind die Kapillare, das Puffersystem, das Hochspannungsnetzteil und der Detektor. Zur Durchführung der CE werden die Enden der Kapillare (Abbildung 1) in zwei Puffergefäße eingetaucht. Geräte, die dem heutigen Stand der Technik entsprechen, besitzen die Möglichkeit diese Puffergefäße sowohl auf der Inlet-Seite (Einlassgefäß) als auch auf der Outlet-Seite (Auslassgefäß) zu wechseln. Dadurch ist gewährleistet, dass notwendige Spülschritte vor oder zwischen den Analysenläufen automatisch mit in die Methodendurchführung integriert werden können, ohne für manuelle Arbeitsschritte gestoppt werden zu müssen. Häufig verwendete Puffersysteme sind Phosphat- und Boratpuffer bei definierter Konzentration. Zu hohe Konzentrationen verursachen eine Zunahme der Wärmeentwicklung infolge eines zu hohen Stromflusses. Dagegen führen geringe Pufferkonzentrationen zur Abnahme der Pufferkapazität. Die Folge sind instabile pH-Werte und damit verbundene Einflüsse auf die Trennbedingungen. Die notwendigen Spannungen von -30 kV bis zu $+30\text{ kV}$ bei Stromstärken zwischen maximal $-200\text{ }\mu\text{A}$ bis $+200\text{ }\mu\text{A}$ stellt das zugehörige Hochspannungsnetzteil bereit. Die Spannung liegt an zwei Platinelektroden an, die neben den Kapillarenden in die Puffergefäße tauchen. Im normalen Modus befindet sich die Anode ((+)-Pol) auf der Seite des Einlassgefäßes und die Kathode ((-)-Pol) auf der Seite des Auslassgefäßes. Je nach Trennproblem und Puffersystem (z. B. bei geladenen Pufferzusätzen) kann es erforderlich sein, dass diese sogenannte positive Polung umgekehrt werden muss, um die Analyten trennen und/oder detektieren zu können. Die Detektion erfolgt online innerhalb der Kapillare ("on column"). An der Stelle der Detektion wird ein Detektionsfenster durch das Entfernen der Polyimidbeschichtung der Kapillare geschaffen. Zur Online-Detektion verwendet man fast ausschließlich optische Methoden. Eine moderne und leistungsfähige Methode stellt die Anbindung an Massenspektrometer dar. Sie vereint die enorme Trennleistung mit den niedrigen Nachweisgrenzen in der Massenspektrometrie mit der Bestimmung des Masse/Ladungsverhältnis (m/z).

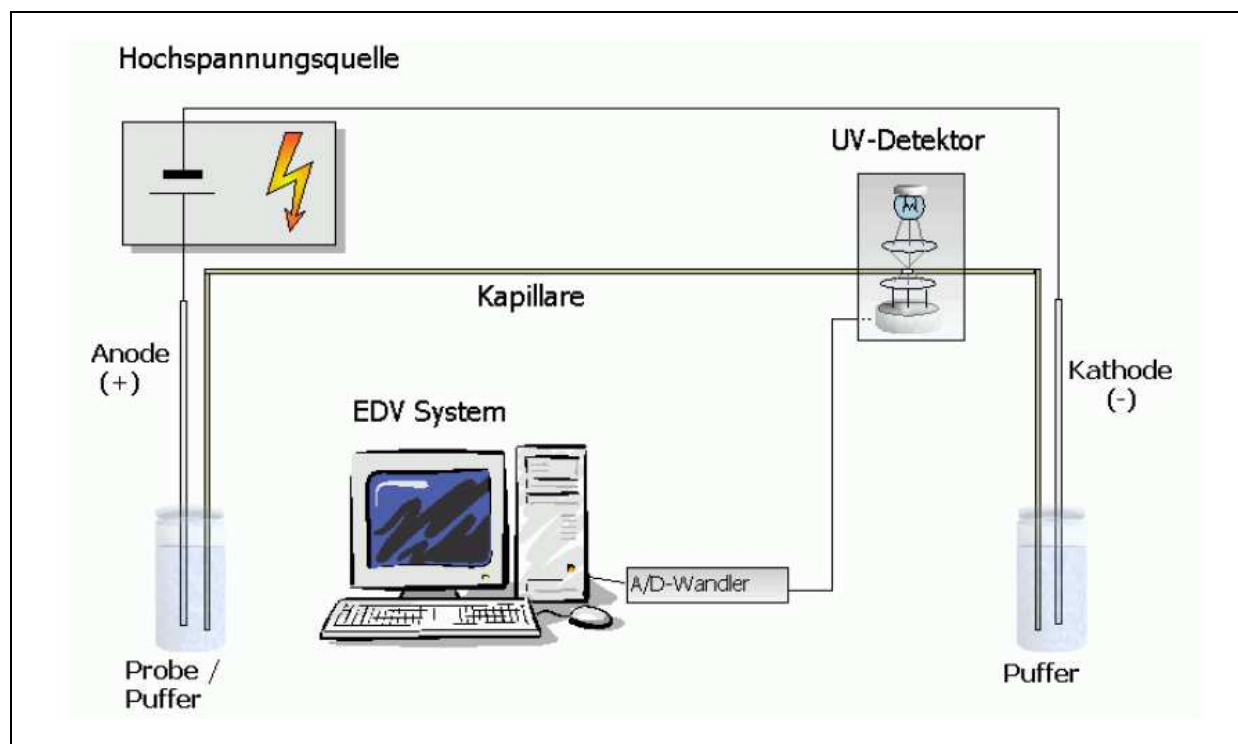


Abbildung 1: Schema einer CE (Abbildung 1.1 aus [2])

2.1.1.1 Kapillaren

Der Sprung der Leistungsfähigkeit kapillarelektrophoretischer Methoden in den beiden letzten Jahrzehnten ist eng verknüpft mit der Entwicklung in der Kapillarherstellung. Um reproduzierbare Trennbedingungen in der Kapillare zu gewährleisten, ist ein hohes Maß an Präzision in der Herstellung erforderlich. Zudem erfolgt die Detektion in der CE innerhalb des Trennsystems (Online-Detektion), so dass der Trennkapillare die Funktion einer Detektorzelle zukommt. Das Kapillarenmaterial muss also den Anforderungen einer effizienten Trennung entsprechen und zusätzlich eine sensitive Detektion ermöglichen. Die in der CE verwendeten Kapillaren [3] (siehe Abbildung 2) bestehen aus Kieselglas (engl. fused silica; SiO_2), das eine sehr hohe UV-Durchlässigkeit besitzt. Die Durchführung von elektrophoretischen Trennungen in dünnen Kapillaren (l_{ges} : 20 – 100 cm) mit üblichen Innendurchmessern (I.D.) von 20 bis 100 μm erlaubt kurze Analysenzeiten und resultiert in eine hohe Trennleistung, die vielen anderen Analysetechniken weit überlegen ist. Die sehr kleinen Innendurchmesser der Kapillaren verbessern das Verhältnis der Oberflächen zum Volumen und führen so zu einer effektiven

Möglichkeit, überschüssige Wärme abzugeben. So ist es möglich, mit sehr großer Spannung zu arbeiten und die Trennleistung weiter zu verbessern. Die geringe Konzentrationsempfindlichkeit der Detektion, die aus den kleinen Innendurchmessern resultiert, wird durch geringere Verdünnungseffekte in dem kleinen Volumen des Kapillarinneren ausgeglichen.

Methodenspezifikationen sollten Angaben über die Dimension (Länge und Kapillarendurchmesser), Beschichtung und Material der Kapillare enthalten. Dabei sollte zwischen der Gesamtlänge (l_{ges}) der Kapillare (direkter Einfluss auf die Feldstärke; Gleichung 3) und der effektiven Länge (l_{det} ; Länge vom Kapillarende der Inlet-Seite bis zum Detektionsfenster) unterschieden werden. Es besteht dabei kein proportionaler Zusammenhang zwischen der Kapillarlänge und der Trennleistung, angegeben als theoretische Trennstufenzahl (n) wie in der HPLC (Säulenlänge \sim Trennleistung). Spezielle Anforderungen bestehender Trennprobleme können eine Beschichtung der Kapillare im Inneren erforderlich machen. Die Ziele der so genannten Coatings sind die Modulation des elektroosmotischen Flusses (EOF; siehe 2.2.2) und die Reduzierung der Wechselwirkungen zwischen den (kationischen) Analyten und der Kapillarwand. Die Kapillaren sind zur Erhöhung der Flexibilität mit einer Schicht aus Polyimid umhüllt (Abbildung 2).

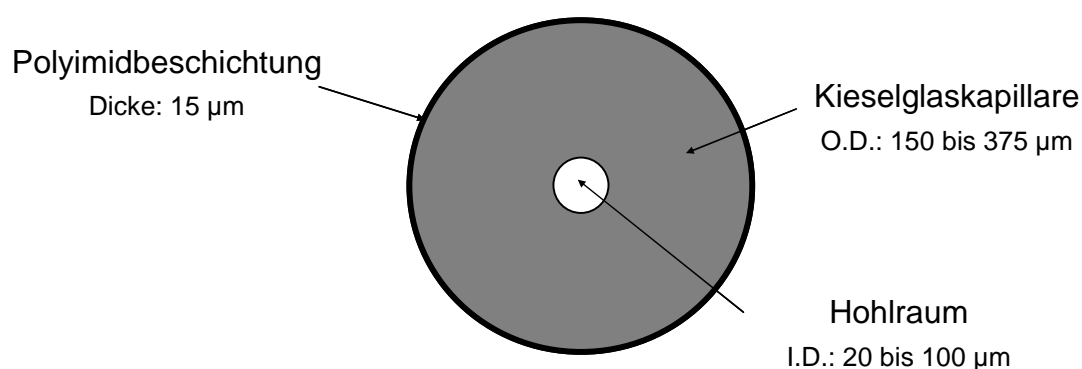


Abbildung 2: Querschnitt durch eine Kapillare

Kapillaren, die aus verschiedenen Herstellungen stammen, unterscheiden sich sehr stark im Hydroxylierungsgrad der Silanolgruppen der Glasoberfläche, was sich direkt auf den EOF (siehe 2.2.2) auswirkt. Um reproduzierbare Trennbedingungen zu erhalten, müssen Kapillaren vor ihrem erstmaligen Gebrauch konditioniert und äquilibriert werden. Dazu wird eine stark alkalische Lösung (1M Natriumhydroxid-Lösung) durch die Kapillare gepumpt und die Silanolgruppen vollständig deprotoniert (Konditionierung). Anschließend wird die Kapillare mit Hintergrundelektrolyt (BGE) gefüllt und Spannung angelegt (Äquilibration), um die erforderlichen Trennbedingungen zu schaffen. In Standardarbeitsvorschriften wird zwischen Konditionierung und Äquilibration häufig ein Spülschritt mit Wasser oder BGE eingeführt, um vor dem Anlegen der Spannung die Kapillare von der Natriumhydroxid-Lösung frei zu spülen. Gerätehersteller empfehlen außerdem die Konditionierung der Kapillare bei erhöhter Temperatur durchzuführen, damit sich das Gleichgewicht schneller einstellen kann. Entscheidend ist aber viel mehr, dass man der Aktivierung der Kapillare vor der ersten Benutzung ausreichend Zeit einräumt. Die einzelnen Spülschritte sollten 30 Minuten oder länger dauern und das Spülvolumen mindestens das 10-fache des Kapillarvolumens umfassen. In Benutzung befindliche Kapillaren werden täglich vor Gebrauch durch eine Spülprozedur, die der oben beschriebenen Abfolge entspricht, aktiviert. Dabei kann die Zeitdauer pro Spülschritt auf 15 Minuten reduziert werden. Das Ziel dieser Maßnahmen ist eine möglichst gleichmäßige Ladungsverteilung und somit ein konstanter elektroosmotischer Fluss.

2.1.1.2 Detektion

Die geringen Probenmengen stellen sehr hohe Anforderungen an die Detektionsverfahren in der Kapillarelektrophorese. Am häufigsten werden modifizierte optische Detektoren aus der HPLC zur Messung der Absorption (UV-Detektor oder Diodenarraydetektor) oder der Emission von Fluoreszenzstrahlung verwendet. Das Hauptproblem ist dabei die Kapillare, welche auch als Küvette fungiert. Zum einen beträgt die Schichtdicke im Fall einer 50 µm Kapillare nur ein Zehntel im Vergleich zu einer HPLC-Durchflusszelle. Zum anderen resultieren aus der kreisförmigen Geometrie der Kapillaren Probleme bei der Fokussierung des

Strahlengangs. Um die Empfindlichkeit zu erhöhen, versucht man durch Linsensysteme das Licht auf das Kapillarlumen zu konzentrieren (Abbildung 3).

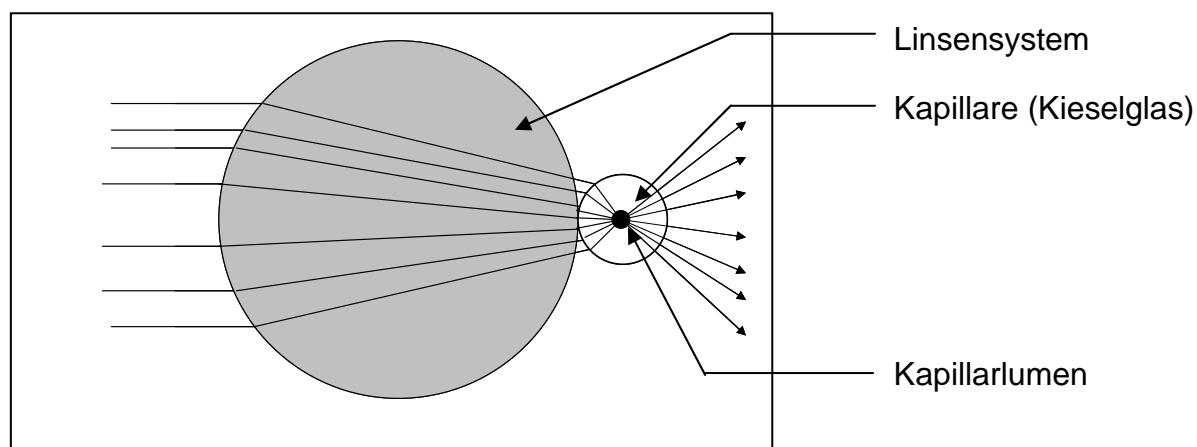


Abbildung 3: Optisches Design einer UV-Detektion

Bei Absorptionsdetektoren ist die Empfindlichkeit durch das Lambert-Beersche Gesetz limitiert. Versuche, die geringe Schichtdicke der dünnen Kapillaren (2.1.1.1) zu vergrößern (blasenförmige Aufweitung des Kapillarinners (Bubble-Cell), z-förmige oder rechteckige Kapillaren), sind nur begrenzt durchführbar [4], da es häufig zu Auflösungsverlusten oder technischen Problemen kommt. Bei geeignetem Fluorophor kann durch den Einsatz eines Fluoreszenzdetektors die Empfindlichkeit um den Faktor 1000 erhöht werden. Durch Kopplung an ein Massenspektrometer kann direkt die Masse bestimmt werden. In den meisten Fällen erhält man ebenfalls eine Erhöhung der Empfindlichkeit, zudem Informationen zur Molekülstruktur und bei koelutierenden Substanzen die Möglichkeit einer zweiten Trenndimension [5]. Als weitere Detektionsarten für die CE seien Leitfähigkeitsdetektoren oder elektrochemische Detektoren genannt.

Die Detektion innerhalb des Trennsystems unterscheidet die Kapillarelektrophorese von chromatographischen Verfahren, wie HPLC und GC. Bei diesen Verfahren wandern die Analyten mit konstanter Geschwindigkeit am Detektorfenster vorbei. Unabhängig von der Aufenthaltsdauer im Trennsystem ist die Aufenthaltsdauer im Detektionsfenster bei allen Probenbestandteilen gleich. Die resultierenden Peakflächen sind nur von der Konzentration und dem Responsefaktor abhängig. Da die Detektion in der Kapillarelektrophorese innerhalb der Kapillare erfolgt, wandern

die Probenbestandteile mit unterschiedlicher Geschwindigkeiten am Detektor vorbei. Die Peakflächen sind abhängig von der jeweiligen Migrations-geschwindigkeit der Analyten. Substanzteilchen mit geringer Wanderungsgeschwindigkeit erzeugen ein stärkeres Signal als Teilchen mit hoher Geschwindigkeit, da sie sich länger innerhalb des Detektionsfensters aufhalten (Abbildung 4). Dadurch absorbieren sie eine größere Menge des eingestrahlten Lichts.

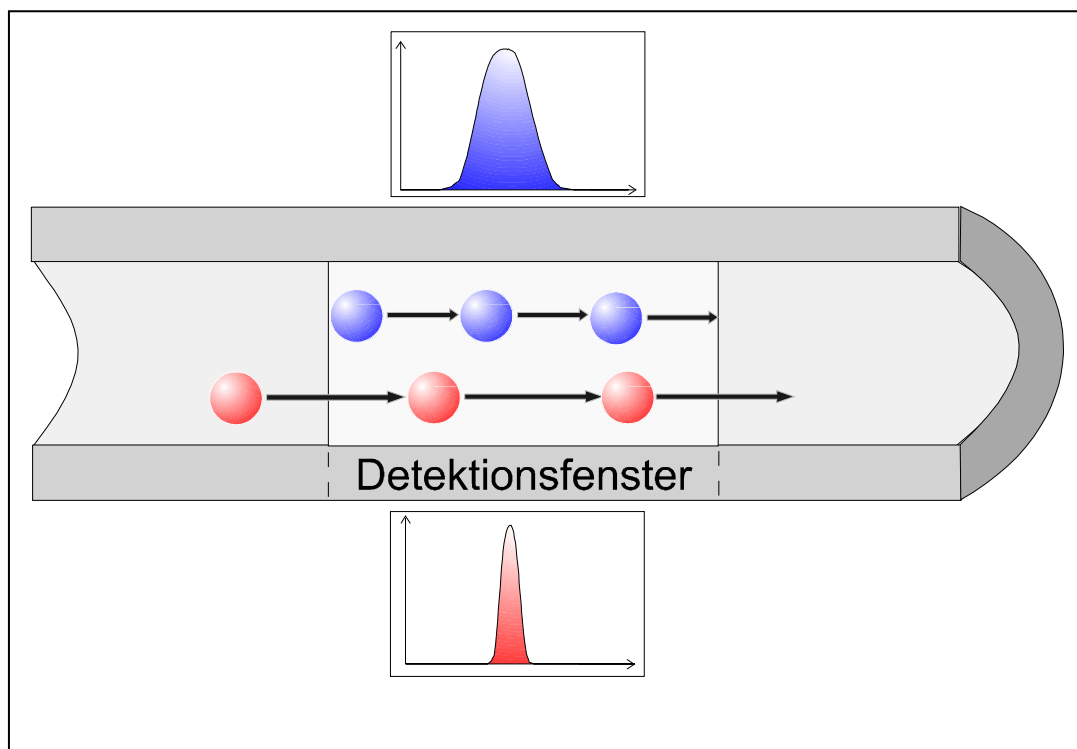


Abbildung 4: Abhängigkeit der Peakflächen von der Migrationsgeschwindigkeit

Um trotzdem miteinander vergleichbare Peakflächen zu erhalten, arbeitet man in der CE nicht mit den absoluten Werten, sondern man bezieht die Peakflächen (AU_{abs}) auf die Migrationzeit und erhält so die Angabe der korrigierte Peakfläche (AU_{kor}), die weitgehend unabhängig von der Migrationszeit ist. Der negative Einfluss auf die Präzision von schwankenden Migrationszeiten zwischen einzelnen Läufen kann dadurch aber nur in begrenztem Maße ausgeglichen werden. Wenn die Ursache für die Abnahme oder Zunahme der elektrophoretischen Mobilität nicht abgestellt werden kann, ist eine Verbesserung der Präzision durch den Einsatz von Internen Standards (4.1) möglich.

2.1.2 Injektion

Zu Beginn der Entwicklung der Kapillarelektrophorese war die Reproduzierbarkeit der Injektionsvolumina ein großes Problem. Zur Injektion kleiner Volumina sind die bekannten Verfahren aus der HPLC nicht einsetzbar. Die ersten Elektrophorese-Instrumente waren mit der mittlerweile veralteten Technik zur Hydrostatischen Injektion ausgerüstet. Durch Anheben des Probengefäßes wird durch die Schwerkraft eine Druckdifferenz erzeugt (Prinzip der kommunizierende Röhren). Durch den daraus resultierenden Siphoneffekt wird die Probe in die Kapillare gesaugt. Das aufgegebene Injektionsvolumen ist von der Höhendifferenz, der Dauer der Injektion und den Hydrodynamischen Eigenschaften der Probenlösung abhängig (siehe Abbildung 5).

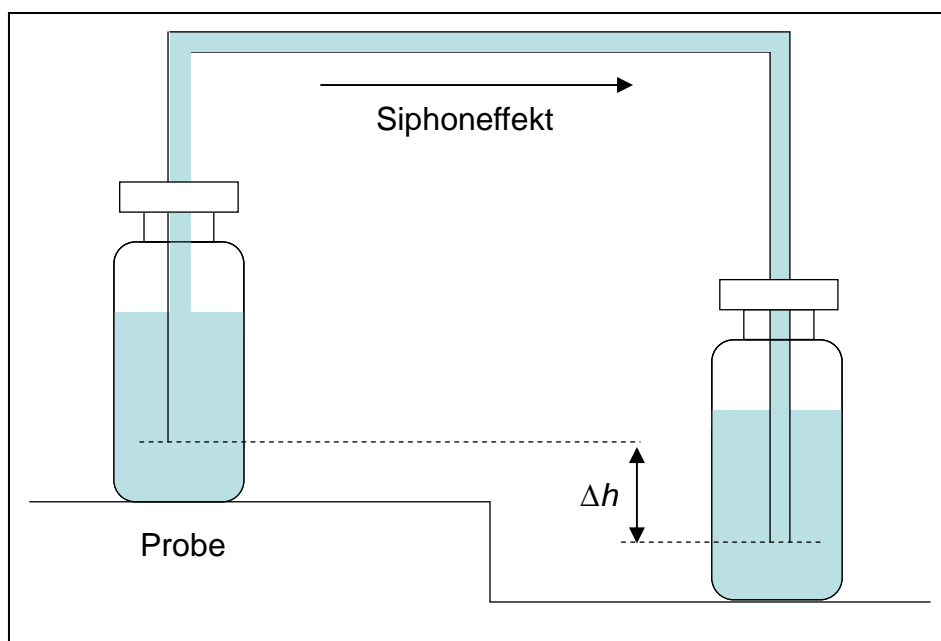


Abbildung 5: Hydrostatische Injektion; Δh : Höhenunterschied zwischen Kapillarein- und austrittsende

Eine entscheidende Weiterentwicklung in der Gerätetechnik war die Ausstattung der CE-Geräte mit einem zusätzlichem Druck-/Vakuumsystem. Während das Spülen der Kapillare beim Konditionieren mit Natronlauge oder beim Äquilibrieren (Spülen mit

Puffer; siehe 2.1.1.1) keine größeren Anforderungen an die Präzision des Pumpensystems stellt, ist für die Probeninjektion durch Anlegen von Über- bzw. Unterdruck ein fein abgestuftes Regelsystem notwendig. Die Probenlösung wird durch den Aufbau eines Überdruckes über der Flüssigkeit auf der Probenseite in die Kapillare gedrückt (Abbildung 6) oder durch ein Vakuum auf der Outletseite in die Kapillare gesaugt. Die Reproduzierbarkeit der Peakflächen und damit der Analytmenge hängt von verschiedenen Faktoren ab. Neben der Dichtigkeit des gesamten Drucksystems hängt bei hydrodynamischer Injektion das Probenvolumen davon ab, dass die Viskosität der laminar strömenden Lösung konstant bleibt. Letztere ist exponentiell abhängig von der Temperatur, so dass isotherme Bedingungen notwendig sind.

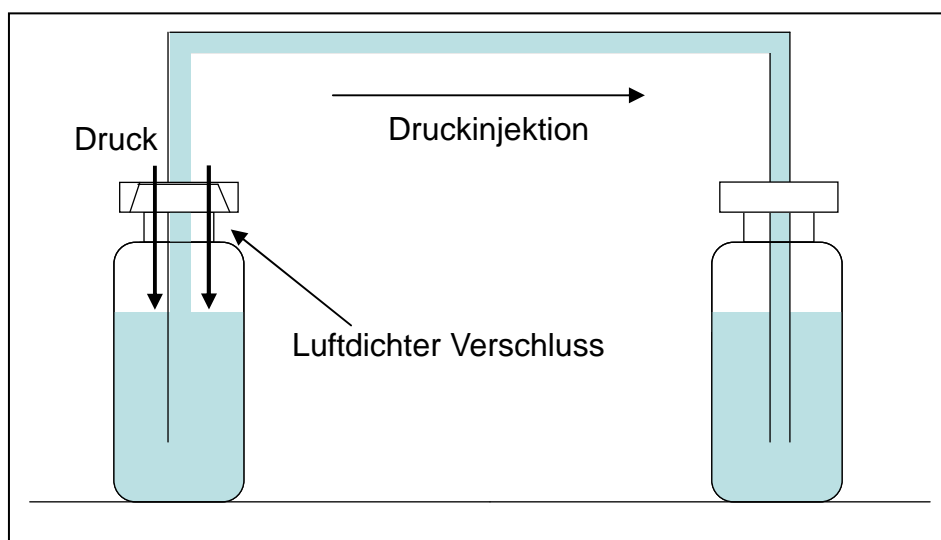


Abbildung 6: Hydrodynamische Injektion

Das injizierte Probenvolumen (V_{inj}) lässt sich mit Hilfe des Hagen-Poiseuilleschen Gesetzes berechnen (Gleichung 1):

$$V_{inj} = \frac{\Delta p \cdot \pi \cdot r^4 \cdot t}{8\eta \cdot l_{ges}} \quad \text{(Gleichung 1)}$$

Δp	:	Injektionsdruck [mbar]
π	:	Kreiszahl (pi); ihr numerischer Wert: $\pi = 3,14159\dots$
r	:	Innenradius der Kapillare [m]
t	:	Injektionszeit [s]
η	:	dynamische Viskosität [$\text{N} \cdot \text{s} \cdot \text{cm}^{-2}$]
l_{ges}	:	Kapillarlänge [m]

Mit Hilfe des Hagen-Poiseuilleschen Gesetzes (Gleichung 1) kann ein weiterer Injektionsparameter berechnet werden: die Länge der Probenzone innerhalb der Kapillare (P_z ; siehe Abbildung 7).

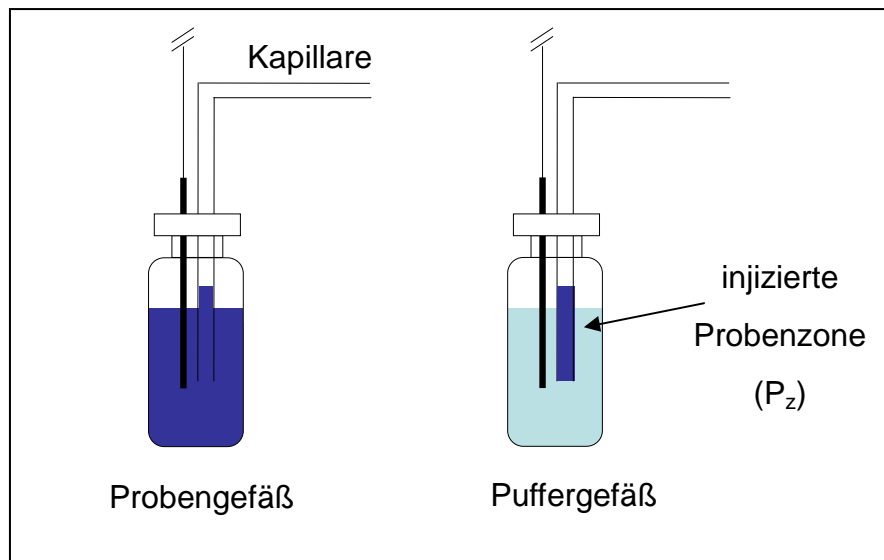


Abbildung 7: Probenaufgabe

Ersetzt man den Radius der Kapillare (r) durch den Durchmesser (d [μm]) und geht bei der Verwendung von wässrigen Probelösungen näherungsweise von dem Wert eins für die dynamische Viskosität (η) aus, erhält man folgende Gleichung zur Berechnung der Probenzone (P_z ; Gleichung 2):

$$P_z [\text{mm}] = \frac{\Delta p \cdot d^2 \cdot t}{3200 \cdot l_{\text{ges}}} \quad \text{(Gleichung 2)}$$

Δp	:	Injektionsdruck [mbar]
d	:	Innendurchmesser der Kapillare [μm]
t	:	Injektionszeit [s]
l_{ges}	:	Kapillarlänge [m]

Eine Fehlerquelle bei der Injektion kann das Abtropfen von kleinen Mengen Probelösung beim Wechsel des Probenvials und Eintauchen der mit Probe beladenen Kapillare in das Puffervial sein. Dieser Fehler wird mit Zunahme der Länge der Probenzone (P_z) geringer. Deshalb sollte die Länge der Probenzone gemäß Gleichung 2 Werte von ca. 5 bis 6 mm annehmen, jedoch keinesfalls unter 3 Millimeter, um eine hohe Injektionspräzision ($\text{RSD}\% < 1\%$) zu erhalten. Einer Bandenverbreiterung durch zu große Probenzonen kann dabei durch Online Probenfokussierung (stacking) [4] entgegengewirkt werden. Wenn durch dieses Verfahren der Bandenverbreiterung nicht ausreichend entgegen gewirkt werden kann, muss durch geringere Injektionsvolumina (geringerer Injektionsdruck; geringere Injektionszeit) die Probenzone verkleinert werden, und die daraus resultierende Injektionsungenauigkeiten durch den Einsatz interner Standards (siehe 4) ausgeglichen werden.

Die elektrokinetische Injektion findet in der Kapillarelektrophorese Anwendung, um ohne zeitaufwendige Probenvorbereitung selektiv Probenbestandteile aus komplizierten Matrices zu injizieren [6]. Dabei wird eine Injektionsspannung zwischen dem Probengefäß auf der Inletseite und dem Auslassgefäß auf der Outletseite angelegt (Abbildung 8). Die Analyten migrieren in die Kapillare, wobei sich die Probenmenge nach dem Produkt aus Zeit und Spannung ergibt.

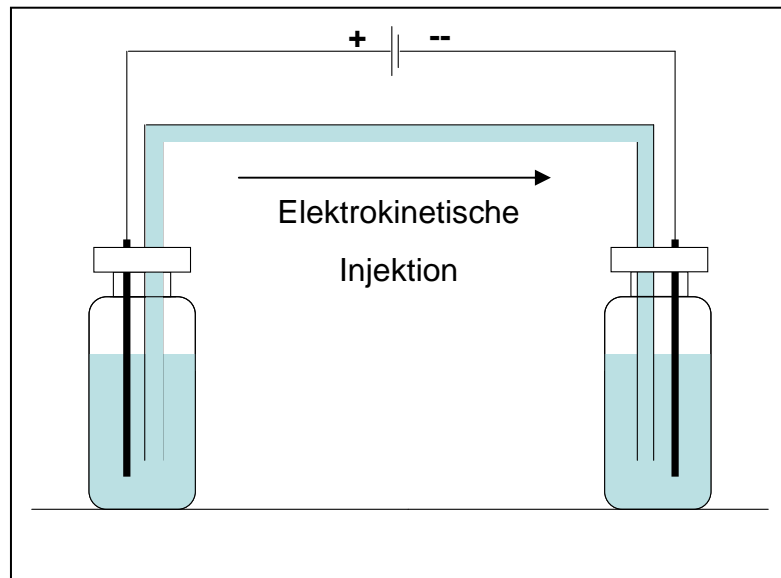


Abbildung 8: Elektrokinetische Injektion

Aufgrund der unterschiedlichen Ladung der Analyten entspricht die Zusammensetzung der Probe in der Kapillare nicht derjenigen im Probengefäß. Entsprechend ihrer Ladung migrieren bei der in Abbildung 8 angelegten Spannung selektiv Kationen in die Kapillare. Bei der direkten Bestimmung z. B. aus Körperflüssigkeiten, kann so die Injektion von störenden Bestandteilen unterdrückt werden. Um Anionen zu injizieren, muss die Polarität an Inlet- und Outletseite getauscht werden. Durch die selektive Injektion nimmt die Konzentration der erfassten Analyte ab. Dieser systematische Fehler muss vor allem bei Quantifizierungen berücksichtigt werden.

2.2 Theoretische Grundlagen

2.2.1 Elektrophoretische Mobilität

Ursache aller elektrophoretischen Trennungen sind die unterschiedlichen Migrationsrichtungen und -geschwindigkeiten geladener Teilchen im elektrischen Feld. Dabei migrieren Anionen zur Anode und Kationen zur Kathode (Abbildung 9).

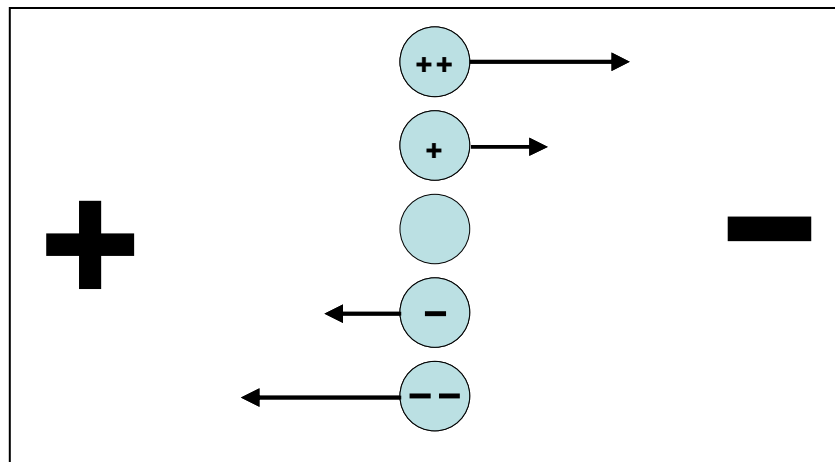


Abbildung 9: Migration im elektrischen Feld

Die elektrische Kraft (F_e), die auf die geladenen Teilchen wirkt, ist proportional zur Feldstärke und zur Ladung des Teilchens (Gleichung 3).

$$F_e = z_i \cdot e_0 \cdot E \quad \text{(Gleichung 3)}$$

- F_e : elektrische Kraft [N]
- z_i : Anzahl der Ladungen pro Teilchen (i)
- e_0 : Elementarladung [$1,602 \cdot 10^{-19} \text{ A} \cdot \text{s}$]
- E : elektrische Feldstärke [$\text{V} \cdot \text{m}^{-1}$]

Der elektrischen Kraft wirken in der Flüssigkeit (Trennpuffer) Reibungskräfte entgegen, die proportional zur dynamischen Viskosität der Flüssigkeit (η), dem Teilchenradius (r_i) und der elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit des Teilchens im elektrischen Feld (v_i) sind.

$$F_R = 6 \cdot \pi \cdot r_i \cdot \eta \cdot v_i \quad \text{(Gleichung 4)}$$

- F_R : Reibungskraft [N]
 r_i : Radius der Teilchen (i) [μm]
 η : dynamische Viskosität [$\text{N} \cdot \text{s} \cdot \text{cm}^{-2}$]
 v_i : Migrationsgeschwindigkeit der Teilchen (i) [$\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$]

Die Gültigkeit, der aus dem Stokes'schen Gesetz abgeleiteten Gleichung 4, besteht nur unter Annahme eines sphärischen, kugelförmigen Körpers (Teilchen i).

Nach kurzer Beschleunigung der Teilchen erreichen diese eine konstante Migrationsgeschwindigkeit, bei der die Reibungskräfte, die auf die wandernden Teilchen einwirken, die elektrische Kraft kompensieren, so dass sich ein Kräftegleichgewicht einstellt.

$$F_R = F_e \quad \text{(Gleichung 5)}$$

Die Geschwindigkeit, mit der sich die Teilchen fortbewegen, lässt sich berechnen in dem man Gleichung 3 (Berechnung der elektrischen Kraft) und 4 (Berechnung der Reibungskraft) in Gleichung 5 (Kräftegleichgewicht) einsetzt und nach v_i (Migrationsgeschwindigkeit) auflöst (Gleichung 6).

$$v_i = \frac{z_i \cdot e_0 \cdot E}{6 \cdot \pi \cdot r_i \cdot \eta} \quad \text{(Gleichung 6)}$$

- z_i : Anzahl der Ladungen pro Teilchen (i)
 e_0 : Elementarladung [$1,602 \cdot 10^{-19} \text{ A} \cdot \text{s}$]
 E : elektrische Feldstärke [$\text{V} \cdot \text{m}^{-1}$]
 r_i : Radius der Teilchen (i) [μm]
 η : dynamische Viskosität [$\text{N} \cdot \text{s} \cdot \text{cm}^{-2}$]

Wie aus Gleichung 6 hervorgeht ist die Migrationsgeschwindigkeit direkt proportional zur elektrischen Feldstärke. Um eine bessere Vergleichbarkeit experimenteller Daten zu bekommen, wird die Migrationsgeschwindigkeit auf diese Größe bezogen. Aus

dem Quotienten der Migrationsgeschwindigkeit und der Feldstärke erhält man so den Begriff der (absoluten) elektrophoretischen Mobilität (μ_i). Diese Größe ist unabhängiger von Versuchsbedingungen und bietet so eine präzise und allgemein gültige Möglichkeit, das elektrophoretische Verhalten von Analyten zu definieren.

$$\mu_i = \frac{v_i}{E} = \frac{z_i \cdot e_0}{6 \cdot \pi \cdot r_i \cdot \eta} \quad \text{(Gleichung 7)}$$

- v_i : Migrationsgeschwindigkeit in idealen Lösungen [$\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$]
 z_i : Anzahl der Ladungen pro Teilchen (i)
 e_0 : Elementarladung [$1,602 \cdot 10^{-19} \text{ A} \cdot \text{s}$]
 E : elektrische Feldstärke [$\text{V} \cdot \text{m}^{-1}$]
 r_i : Radius der Teilchen (i) [μm]
 η : dynamische Viskosität [$\text{N} \cdot \text{s} \cdot \text{cm}^{-2}$]

Diese stoffspezifische Größe kann experimentell nicht erfasst werden. Die vorangegangenen Gleichungen sind prinzipiell nur für unendlich verdünnte Lösungen gültig. Die in der Kapillarelektrophorese eingesetzten Elektrolytlösungen weichen von dieser Modellvorstellung ab. Die wandernden Ionen sind in wässrigen Lösungen nicht nur von einer Solvathülle umgeben, sondern werden zusätzlich von Gegenionen angezogen und von ihnen umgeben. Als Konsequenz ergibt sich ein größerer Teilchenradius R_{eff} als der angenommene Radius der Teilchen r_i und eine geringere effektive Ladung (Q_{eff}) der Teilchen. Unter Berücksichtigung dieser Anpassungen erhält man anstelle der absoluten elektrophoretischen Mobilität die effektive elektrophoretische Mobilität, die mittels der beobachteten Migrationsgeschwindigkeit bestimmt werden kann (Gleichung 8).

$$\mu_{\text{eff}} = \frac{v_d}{E} = \frac{Q_{\text{eff}}}{6 \cdot \pi \cdot R_{\text{eff}} \cdot \eta} \quad \text{(Gleichung 8)}$$

- v_d : experimentell erhaltene Migrationsgeschwindigkeit [$\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$]
 E : elektrische Feldstärke [$\text{V} \cdot \text{m}^{-1}$]

- R_{eff} : Teilchenradius in wässriger Lösung (Solvathülle) [μm]
 η : dynamische Viskosität [$\text{N} \cdot \text{s} \cdot \text{cm}^{-2}$]
 Q_{eff} : effektive Ladungszahl der Teilchen (i) [$\text{A} \cdot \text{s}$]

2.2.2 Elektroosmotischer Fluss (EOF)

Während die Elektrophorese die Trennung von Teilchen unterschiedlicher Mobilität bewirkt, verursacht die Elektroosmose einen Fluss der Pufferlösung im elektrischen Feld. Der elektroosmotische Fluss (EOF) beeinflusst die Geschwindigkeit aller Teilchen, leistet aber keinen Beitrag zur Trennung der Substanzen. Zur Teilchenwanderungsgeschwindigkeit, resultierend aus der elektrophoretischen Mobilität der Teilchen, addiert sich sowohl bei negativ und positiv geladenen als auch bei neutralen Molekülen immer derselbe Betrag (Abbildung 10).

Wie aus Abbildung 10 hervor geht, ist der EOF verantwortlich dafür, dass Anionen zum Detektorfenster transportiert werden. Der EOF wirkt entgegen der Wanderungsrichtung negativ geladener Moleküle in Richtung der Kathode und transportiert diese an dem Detektorfenster vorbei. Die Methodenbedingungen müssen so gewählt werden, dass der Betrag der Geschwindigkeit des elektroosmotischen Fluss größer ist als der Betrag der Wanderungsgeschwindigkeit des sich am schnellsten in Gegenrichtung bewegenden Anions. Dieses Molekül kann sonst nicht detektiert werden.

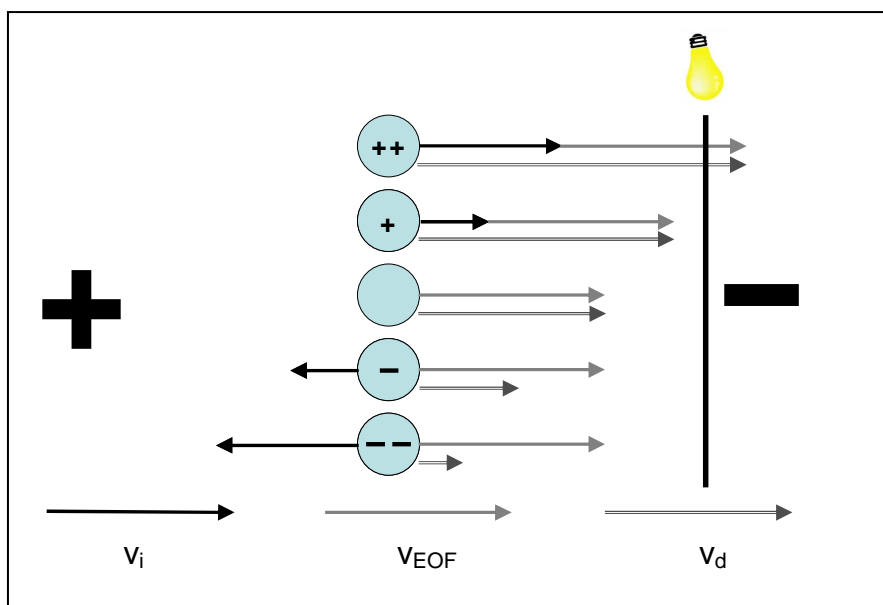


Abbildung 10: Einfluss des EOFs

v_d	experimentell erhaltene Migrationsgeschwindigkeit [$\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$]
v_{EOF}	Wanderungsgeschwindigkeit elektrisch neutraler Teilchen [$\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$]
v_i	Migrationsgeschwindigkeit der Teilchen (i) [$\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$]

Ursache des elektroosmotischen Flusses ist die Aufladung der inneren Kapillaroberfläche. Die Oberfläche besteht aus amorphem, polymerem Siliciumdioxid. Neben Siloxanen, die das Gerüst des Glases bilden, findet man Si-OH-Gruppen, sogenannte Silanole. Die schwach sauren Silanolgruppen (pK_s : 3,5 bis 8,2) werden ab einem pH-Wert von 2 deprotoniert, so dass die Oberfläche negativ aufgeladen ist (siehe Abbildung 11). An diese negativen Ladungen lagern sich Kationen aus der Pufferlösung an. Dabei bildet sich eine elektrostatische Doppelschicht aus, bestehend aus einer starren (Sternschicht) und einer mobilen, diffusen Grenzschicht. Nach von Helmholtz tritt generell an der Grenzfläche zwischen zwei Phasen eine elektrostatische Doppelschicht auf. Die starre Ebene stellt die innere Phase der elektrostatischen Doppelschicht dar und wird deshalb auch als innere Helmholtz-Schicht (i.H.p.) bezeichnet. Das Model nach Stern beschreibt, dass diese Schicht von fest adsorbierten Kationen ausgebildet wird, die bei der Anlagerung ihre Solvathüllen verlieren und als vollständig unbeweglich angesehen werden. In der diffusen Grenzschicht, welche auch als Debye-Hückel-Schicht oder äußere Helmholtz-Schicht (o.H.p.) bezeichnet wird, liegt ebenfalls ein Überschuss an Kationen vor, die im Unterschied zu den Ionen der i.H.p. noch hydratisiert sind und sich in der Lösung bewegen. Die Phasengrenze dieser mobilen Schicht ist nicht scharf umrissen und geht in die elektrisch neutral erscheinende wässrige Phase in der Kapillare über. Die Ladungsverteilung in der Doppelschicht führt zur Ausbildung eines Potentials, das in den beiden Schichten unterschiedlich abfällt: In der starren Grenzschicht verläuft der Potentialabfall linear. In der diffusen Grenzschicht hingegen exponentiell. Dieses stark abfallende Potential wird als ξ -(Zeta-)Potential bezeichnet und ist verantwortlich für die Elektroosmose.

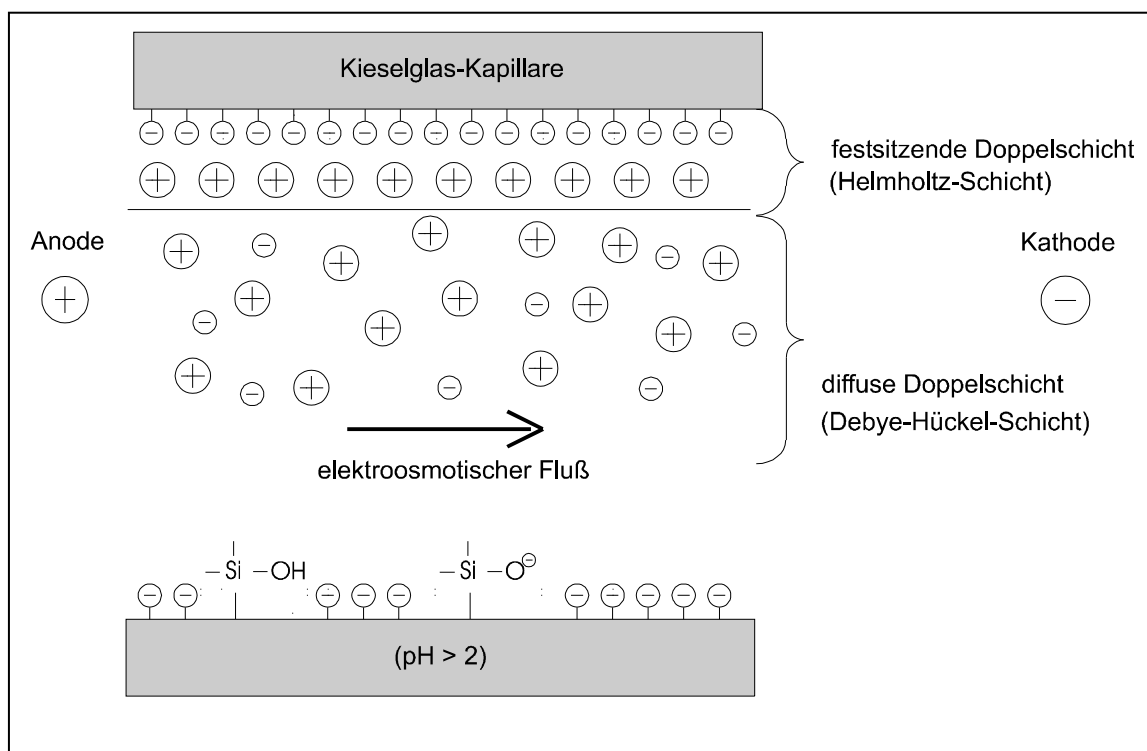


Abbildung 11: Endstehung des EOFs

Beim Anlegen eines elektrischen Feldes beginnen sich die beweglichen Kationen aus der diffusen Schicht (o.H.p.) entlang der Scherebene in Richtung Kathode zu bewegen. Durch die Solvathülle sind die wandernden Ionen in die Clusterstruktur der Wassermoleküle (Wechselwirkungen der Wassermoleküle durch Wasserstoff-Brückenbindungen und Dipol-Dipol-Bindungen) eingebunden, so dass das gesamte Kapillarvolumen in Bewegung versetzt wird. Die für die Bewegung verantwortliche Kraft resultiert aus der Wanderung der Kationen nahe der Kapillarwand (o.H.p.). Dies führt, verglichen mit der HPLC, zu einem sehr flachen Strömungsprofil (Abbildung 12a), welches eine wesentlich geringere Bandenverbreiterung verursacht als das parabolische Strömungsprofil bei typischen hydrodynamischen Flüssen (Abbildung 12b) und ist somit einer der Hauptgründe für die hohe Trennleistung kapillarelektrophoretischer Trennungen.

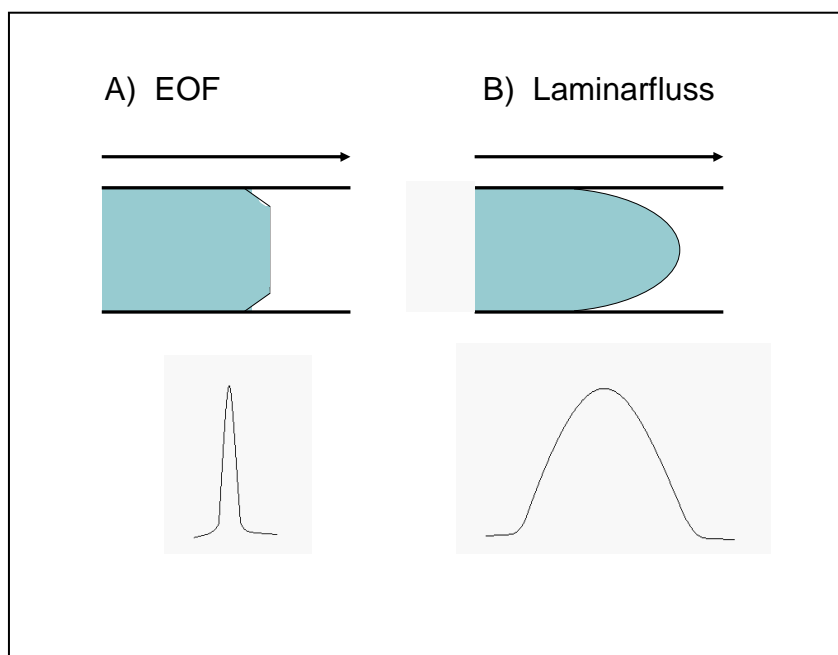


Abbildung 12: Strömungsprofile und Peakverbreiterung

In Abbildung 10 ist zu erkennen, dass elektrisch neutrale Substanzen ausschließlich durch den elektroosmotischen Fluss transportiert werden. Deshalb werden in der Praxis oft neutrale Substanzen zur Probe gegeben, um den EOF zu markieren, der als wichtiger Indikator für die Robustheit einer Methode gilt. Neben einer ausreichenden Löslichkeit in der Elektrolytlösung müssen Substanzen, die als EOF-Marker eingesetzt werden, über einen großen pH -Bereich elektrisch neutral reagieren, dürfen nicht mit der Kapillaroberfläche interagieren und müssen in Abhängigkeit von dem gewählten Detektionsverfahren ein ausreichend großes Messsignal liefern. Unter Berücksichtigung der Gleichungen aus Kapitel 2.2.1 kann die elektrophoretische Mobilität (μ_{EOF}) für neutrale Teilchen berechnet werden (Gleichung 10), wenn für die Berechnung der Geschwindigkeit (v_{EOF}) Gleichung 9 zugrunde gelegt wird:

$$v_{\text{EOF}} = \frac{I_{\text{det}}}{t_{\text{det}}} \quad \text{(Gleichung 9)}$$

$$\mu_{\text{EOF}} = \frac{v_{\text{EOF}}}{E} = \frac{l_{\text{det}}}{t_{\text{det}}} \cdot \frac{l_{\text{ges}}}{U} \quad [\text{cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}] \quad \text{(Gleichung 10)}$$

v_{EOF} : Wanderungsgeschwindigkeit elektrisch neutraler Teilchen [$\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$]

l_{det} : effektive Kapillarlänge [cm]

l_{ges} : gesamte Kapillarlänge [cm]

U : Spannung [V]

Wie beschrieben, leistet der EOF keinen Beitrag zur Trennung der Teilchen. Durch seinen Einfluss auf die Gesamtmobilität aller Analyten und die Analysenzeit wirkt er sich aber indirekt auf die Trennleistung des Systems aus. Deshalb ist ein definierter, stabiler elektroosmotischer Fluss nicht nur wichtig für die Reproduzierbarkeit kapillarelektrophoretischer Trennungen, sondern auch für die Selektivität und Auflösung von CE-Methoden. Der EOF kann durch viele Methodenparameter beeinflusst werden [1, 7] (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: Möglichkeiten zur Beeinflussung des EOFs
Stärke des elektrischen Feldes
pH-Wert des Puffers (BGE)
Pufferkonzentration
Temperatur
Organische Lösungsmittel
Tenside als Pufferzusatz
Kovalente Kapillarcoatings
Zusatz ionischer Polymere

Drei Möglichkeiten zur Beeinflussung des EOFs sollen im Folgenden näher beschrieben werden.

Mit zunehmendem pH -Wert steigt auch der Betrag der elektrophoretischen Mobilität des EOFs. Für diesen Effekt ist der direkte Einfluss der Silanolgruppen der Glasoberfläche auf das Dissoziationsgleichgewicht verantwortlich. Bei einem höheren pH -Wert nimmt die negativ-elektrostatische Aufladung der Kapillarwand zu und der Zug der sich anlagernden Kationen in Richtung Minuspol im elektrischen Feld wird verstärkt (Abbildung 11).

Durch den Zusatz von kationischen Tensiden kann, abhängig von der eingesetzten Konzentration der oberflächenaktiven Substanz, der EOF abgeschwächt, gänzlich zum Erliegen gebracht oder umgekehrt werden. Der polare Kopf von kationischen Tensiden lagert sich in Konkurrenz zu den Kationen des BGE an die negativ aufgeladene Kapillarwand an (Abbildung 13B). Die so in das Kapillarinnere hineinragende lipophile Kohlenwasserstoffkette behindert den Fluss in der Kapillare. Bei höherer Tensidkonzentration kann dies dazu führen, dass die gesamte Glasoberfläche mit Tensidmolekülen belegt ist und der EOF zum Erliegen kommt (Abbildung 13C). Wird über diese kritische Konzentration hinaus der Tensidgehalt erhöht lagern sich die Moleküle umgekehrt ein (Wechselwirkung der Kohlenwasserstoffketten) und die Wandaufladung kehrt sich durch diese Doppellayerschicht ins Positive um (Abbildung 13D). Die sich nun anlagernden Anionen aus der Pufferlösung sorgen dafür, dass der EOF nun in die entgegengesetzte Richtung zur Anode fließt.

Die Eliminierung des EOFs durch kovalente Beschichtungen der Kapillarwand (Coating) hat neben der Optimierung von Trennleistung und Analysenzeit für viele Anwendungen in der CE große Bedeutung. So wird durch Kapillarcoating in der CZE der Einfluss der Silanol-Gruppen auf das Adsorptionsverhalten von Proteinen zurückgedrängt. Eine Fokussierung von Proteinbanden entlang eines pH -Gradienten, wie sie in der CIEF Anwendung findet, wäre ohne EOF-Eliminierung nicht möglich. Neben anderen Stoffklassen wie Kohlenhydraten, Polyethylenglykolen oder aliphatischen Kohlenwasserstoffen wird vor allem Polyacrylamid (LPA) als Beschichtungsmaterial eingesetzt.

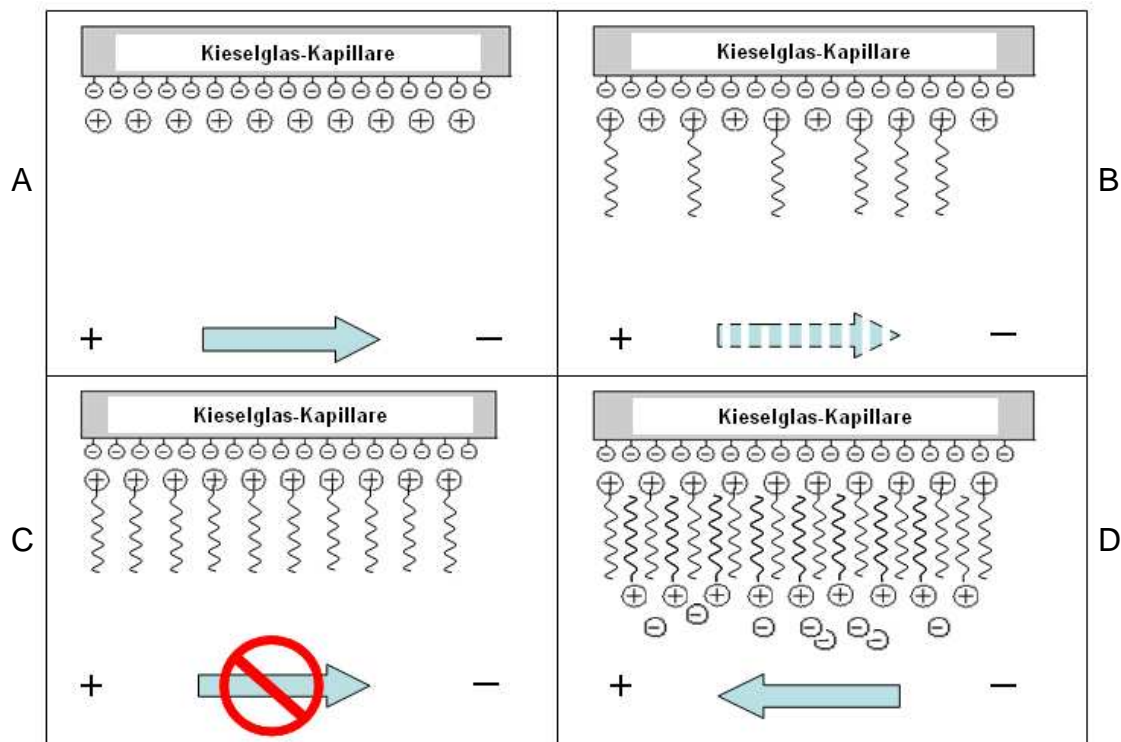


Abbildung 13: Einfluss von Tensidzusatz zum Puffer auf den EOF

- A: EOF in Richtung Kathode
- B: Abschwächung des EOFs
- C: Unterdrückter EOF
- D: Umkehrung des EOFs

2.2.3 Trennprinzip

„Trennung von geladenen Teilchen im elektrischen Feld.“ – kürzer ist das Grundprinzip elektrophoretischer Methoden nicht zu beschreiben. In der Kapillarelektrophorese, als trägerfreies Verfahren, werden die Analyten in einer mit Puffer gefüllten Kapillare nach unterschiedlichem Ladungs-/Massenverhältnis getrennt. Je größer die Ladung bezogen auf die Molekülmasse ist, desto schneller bewegen sich die Analyten in Richtung der Elektrode mit gegensätzlicher Ladung (Abbildung 9). Dabei wird die elektrische Mobilität der Teilchen überlagert von der Stärke und Richtung des EOFs (2.2.2; Abbildung 14). Abhängig von Pufferzusätzen

und der zur Anwendung kommenden Methode (2.1) basieren die Trennungen auf verschiedenen Prinzipien in der Kapillarelektrophorese (Tabelle 2).

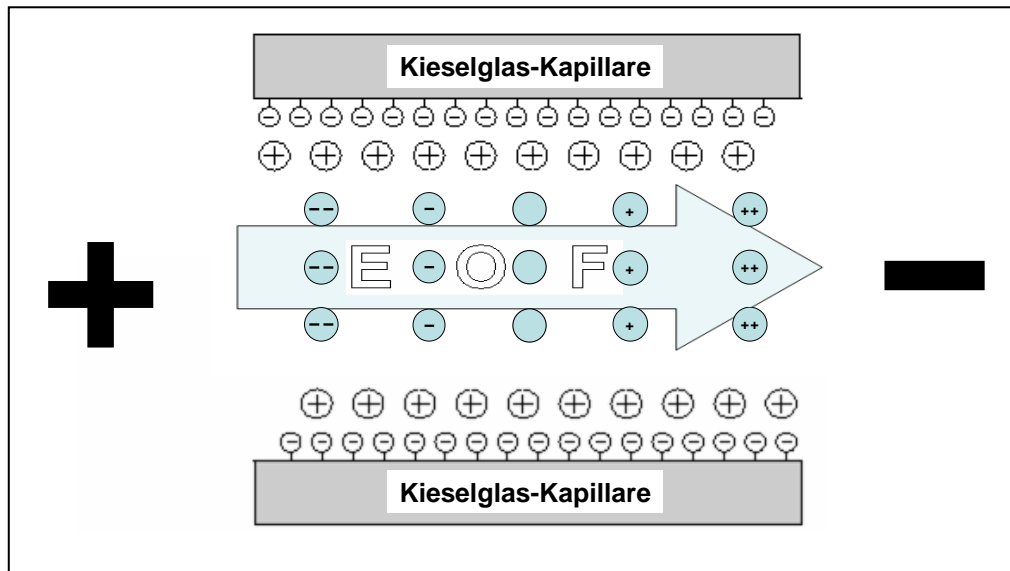


Abbildung 14: Trennprinzip der CE

Tabelle 2: Übersicht über CE-Methoden und ihre Trennprinzipien	
CE-Methode	Trennprinzip
Kapillarzonenelktrophorese (CZE)	Ladung, Ladungsdichte
Mizellare elektrokinetische Chromatographie (MEKC; 2.3)	Wechselwirkungen mit pseudostationärer Phase (Hydrophobizität, Komplexierung), Ladung
Kapillargelelektrophorese (CGE)	Größe, Ladung
Kapillarisoelektrische Fokussierung (CIEF)	pI- Werte (Isoelektrischer Punkt)
Isotachophorese (ITP)	Elektrophoretische Mobilität (Ausbildung eines selbststabilen Trennmusters zwischen Leit- und Folgelektrolyt)

2.3 Mizellare Elektrokinetische Chromatographie (MEKC)

Seit den ersten Arbeiten zur MEKC von Terabe et al. [8, 9] ist diese Variante der Kapillarelektrophorese durch fortwährende Methodenentwicklungen und Optimierungen sowie einer Vielzahl von Anwendungen zu einer hoch effizienten CE-Trenntechnik gereift. Ursprünglich war die MEKC entwickelt worden, um neutrale Moleküle elektrophoretisch trennen und quantifizieren zu können, da die CE prinzipiell nur zur Trennung geladener Komponenten eines Gemisches herangezogen werden kann (2.2.3). Mittels MEKC ist mittlerweile sowohl die Trennung neutraler Moleküle als auch die von Ionen möglich. Neben einer außerordentlich hohen Selektivität liegen weitere Vorteile dieser Technik in kurzen Analysenzeiten und einer flexiblen und effektiven Methodenentwicklung. Diese Effizienz resultiert aus dem Zusammenspiel des zugrunde liegenden elektrophoretischen und chromatographischen Trennmechanismus. Dafür sind folgende Phänomene von Bedeutung: Elektroosmose (2.2.2), Elektrophorese (2.2.1) und die Verteilung zwischen zwei Phasen. Durch die Zugabe von anionischen Tensiden oberhalb der kritischen mizellaren Konzentration (CMC) zum Hintergrundelektrolyten lagern sich Tensidmoleküle zu Mizellen zusammen. Häufig wird das Tensid Natriumdodecylsulfat (SDS; Abbildung 15) in der MEKC verwendet.

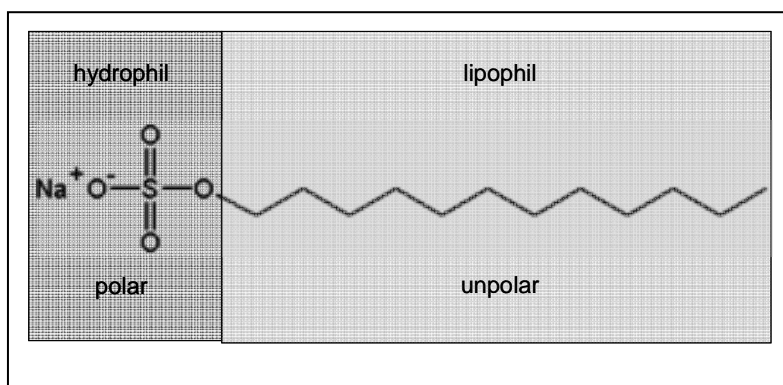


Abbildung 15: SDS (oberflächenaktiv)

In der Pufferlösung bilden die Mizellen eine von der wässrigen Phase unterscheidbare zweite Phase, die mizellare Phase, welche im elektrischen Feld gegenüber der wässrigen Phase verzögert ist (Abbildung 16). In Analogie zur Chromatographie wird die wässrige Phase daher auch als mobile Phase und die mizellare Phase als pseudostationäre Phase bezeichnet.

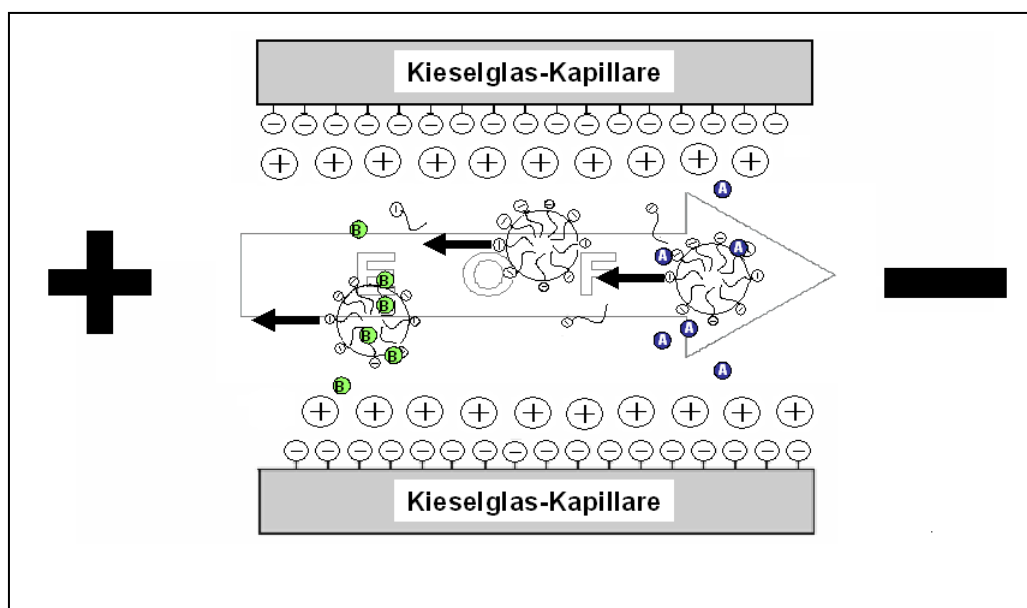


Abbildung 16: Trennprozess der MEKC

Die zu bestimmenden Analyten werden gemäß ihrem Verteilungskoeffizienten K zwischen der wässrigen und mizellaren Phase verteilt. Moleküle, die starke Wechselwirkungen mit den Mizellen zeigen, werden zurückgehalten. Weniger stark interagierende Moleküle können ohne Verzögerung mit dem EOF durch die Kapillare wandern. Das bedeutet, dass die Geschwindigkeit der Analyten im elektrischen Feld abhängig vom Verteilungskoeffizienten K ist. Dieser ist definiert als Quotient aus der Konzentration des Analyten in der pseudostationären Phase und der Konzentration des Analyten in der mobilen Phase (thermodynamisches Gleichgewicht). Zusätzlich können Probemoleküle an der Mizelloberfläche adsorbiert werden und auf diese Weise mit den Mizellen interagieren. Deshalb wird das bei der MEKC zugrunde liegende Trennprinzip auch dem der Umkehrphasenchromatographie (Verteilungs- und Adsorptionschromatographie) zugeschrieben.

Wenn jedoch die in der Pufferlösung gelösten und zu trennenden Analyten über eine elektrophoretische Mobilität (μ_{eff}) verfügen, dann ist die Migrationsreihenfolge nicht mehr ausschließlich durch die unterschiedlich starken Interaktionen mit den Mizellen festgelegt, sondern wird ebenfalls durch Unterschiede in μ_{eff} mitbestimmt.

Des Weiteren können die sich ausbildenden Interaktionen zwischen den Analytmolekülen und den Mizellen durch Pufferzusätze beeinflusst werden. Zusätze, wie organische Lösungsmittel (z. B. Methanol), haben dabei direkten Einfluss auf den Verteilungskoeffizienten K . Andere Zusätze, wie z. B. Cyclodextrine, beeinflussen die Ausbildung der Interaktionen zwischen den Molekülen und den Mizellen. Die Komplexität dieser Methodenparameter begründet die hohe Selektivität mizellar elektrokinetischer Methoden, macht aber eine strukturierte Methodenentwicklung erforderlich.

2.4 Enantiomerentrennung mittels Kapillarelektrophorese

2.4.1 Einleitung

Ungefähr die Hälfte aller auf dem Markt befindlichen Wirkstoffe ist chiral und davon der Großteil als racemische Verbindung im Handel. Enantiomere (Bild und Spiegelbild einer optisch aktiven Verbindung) unterscheiden sich in ihren pharmakodynamischen sowie pharmakokinetischen Eigenschaften. Dabei kann es sich um geringe Unterschiede handeln, so dass der Einsatz des Racemats ohne Bedenken erfolgen kann. Bei einer Vielzahl von Wirkstoffen, wie z. B. Thalidomid

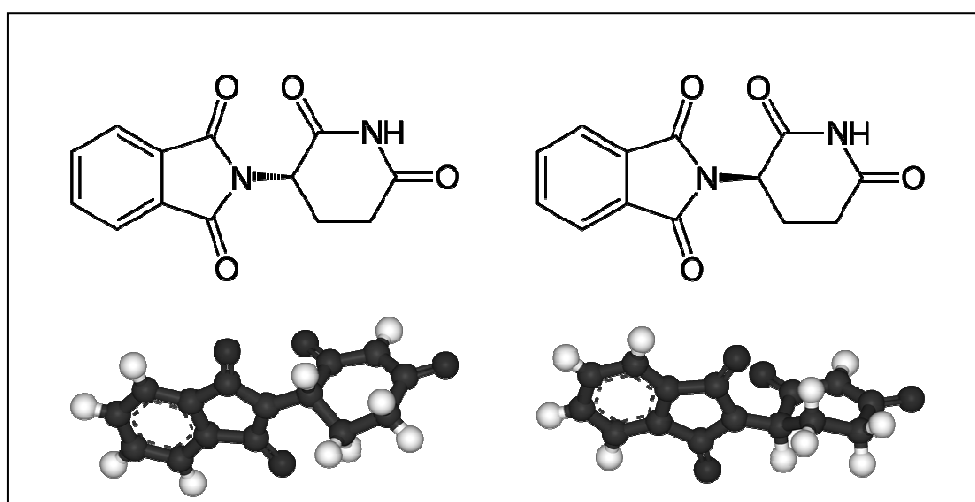


Abbildung 17: Thalidomid

(Contergan-Skandal Ende der 1950er Jahre; s. Abbildung 17) oder Methadon, wird das Racemat gar nicht mehr oder nur unter strenger ärztlicher Aufsicht verwendet, da nur ein Enantiomer physiologisch wirksam und unbedenklich ist, während das andere

schädigenden Wirkung besitzt. Im Fall von Methadon wird bei auftretenden Unverträglichkeiten auf Levomethadon umgestellt.

Auch wenn die unerwünschten Arzneimittelwirkungen des Distomers (biologisch inaktives Enantiomer) nicht so drastisch wie in den genannten Beispielen sind, ist das Eutomer (biologisch aktives Enantiomer) in racemischen Mischungen als zu 50 Prozent verunreinigt anzusehen (Tabelle 3). Da das Distomer ebenfalls metabolisiert werden muss und es den Organismus unnötig belastet.

Tabelle 3: Beispiele für Unterschiede zwischen R- und S-Enantiomer		
Substanz	R-Form	S-Form
Thalidomid [10]	beruhigend (+)	fruchtschädigend (-)
Asparagin [11]	schmeckt süß (+)	schmeckt bitter (-)
Methadon [12, 13]	analgetisch aktiv (-)	inaktiv (+)
Limonen	riecht nach Orange (+)	riecht nach Terpentin (-)
Penicillamin [14]	extrem toxisch (+)	Antiarthritikum (-)
Propranolol [15]	Blutdruck senkend (-)	wenig aktiv (+)
Ethambutol	verursacht Blindheit (+)	Tuberkulostatikum (-)

Zulassungen von enantiomerenreinen Wirkstoffen sind daher von großer Bedeutung und deren Anzahl hat sich in den letzten Jahren deutlich erhöht. Im Zeitraum von 1983 bis 2002 ist der Prozentsatz der Zulassungen von Racematen von 32 % auf 8 % gesunken. Im gleichen Zeitraum ist der Anteil der Zulassungen von einantiomerenreinen Wirkstoffen von 25 % auf 58 % gestiegen [16]. Verstärkt wird diese Entwicklung durch immer zielgerichtete Wirkstoffforschung, die sich auf stereoselektive Angriffspunkte im Körper richtet. Während der Entwicklung chiraler Wirkstoffkandidaten stellen leistungsstarke enantioselektive Analysemethoden einen erforderlichen Grundstein für eine erfolgreiche Wirkstoffforschung und – beschreibung dar. Die Kontrolle der Ausgangsstoffe und Produkte enantioselektiver Synthesen zur Darstellung der chiralen Zentren im Wirkstoffmolekül erfordern ebenso

von Anfang an sensitive Methoden, wie die Kontrolle nachfolgender Syntheseschritte, um die Stabilität der chiralen Verbindung nachweisen zu können. Im Weiteren Entwicklungszyklus sind enantioselektive Methoden zur Spezifizierung des Wirkstoffs und enantiomerer Verunreinigungen erforderlich. Gleiches gilt für den Nachweis der Qualität möglicher Arzneimittelformulierungen und Methoden für die Freigabe- und Routineanalytik.

Die Herausforderung in der Trennung von Enantiomerenpaaren ergibt sich aus der Tatsache, dass sich beide in ihren physikochemischen Eigenschaften nicht unterscheiden. Sie differieren allein in dem gegensätzlichen Winkel mit dem sie linear polarisiertes Licht drehen und in ihrem unterschiedlichen Verhalten in chiraler Umgebung. Die Prüfung nach Arzneibuch auf Enantiomerenreinheit basiert in vielen Fällen immer noch auf der polarimetrischen Bestimmung dieses Drehwinkels [17]. Traditionelle „off-line“-Methoden erfordern aber zeitintensive Probenvorbereitung und zu hohen Materialeinsatz. Dazu kommt eine geringe Leistungsfähigkeit bezogen auf die Robustheit, Präzision und vor allem die Selektivität, so dass die Polarimetrie den Anforderungen aktueller Wirkstoffforschung nicht mehr gerecht wird. Im Gegensatz dazu haben sich chromatographische Methoden mit hoher Trennleistung, wie Gaschromatographie (GC) [18], Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) [19-29], Überkritische Flüssigchromatographie (SFC) [30-33] und Kapillarelektrophorese (CE) [34-46] etabliert [47]. Allen Trenntechniken ist gemein, dass Diastereomere gebildet werden müssen, um Enantiomere unterscheiden zu können. Das geschieht unter Zusatz eines chiralen Selektors, entweder unter Ausbildung von kovalenten (chemisch stabilen) Bindungen oder nichtkovalenten Wechselbeziehungen zu den zu trennenden chiralen Probemolekülen. Als indirekte Methode wird die Derivatisierung der Probenmoleküle mit chiralen Reagenzien vor der chromatographischen Analyse bezeichnet. Dabei steht eine große Auswahl an Derivatisierungsreagenzien zur Verfügung. Der Vorteil dieser indirekten Trennmethode ist, dass für die Auftrennung der gebildeten Diastereomerenpaare achirale mobile und stationäre Phasen verwendet werden können. Zudem können im Derivatisierungsschritt funktionelle Gruppen in die Probenmoleküle eingeführt werden, um die Bestimmung schlecht zu detektierender Stoffe zu verbessern (Erhöhung der Empfindlichkeit) [48]. Heutzutage ist das die einzige Nische, die noch durch indirekte Methoden besetzt wird. Die auch hier aufwendige Probenvorbereitung [34] entspricht nicht mehr den hohen

Durchsätzen moderner Analytik. Zudem verlaufen Derivatisierungsreaktionen komplizierter Moleküle (viele verschiedene funktionelle Gruppen) selten eindeutig und die erforderlichen Reaktionsbedingungen, um eine 100 %ige Derivatisierung zu erhalten, können empfindliche Wirkstoffmoleküle angreifen.

Direkte Methoden, die auf der Ausbildung reversibler, nichtkovalent gebundener Diastereomerenkomplexe beruhen, finden in der Analytik im Rahmen aktueller Wirkstoffforschung vermehrt Anwendung. Hohe Trennleistungen können dabei durch zwei verschiedene Strategien erreicht werden: Zugabe von chiralen Additiven zur mobilen Phase oder die Verwendung von chiralen stationären Phasen. Abbildung 18 zeigt zu welchen Techniken zur chiralen Trennungen im Zeitraum von 1980 bis 2007 am meisten Publikationen veröffentlicht wurden. Die Auswertung basiert auf einer Datenbankrecherche in SciFinder Scholar vom 15. Januar 2008. Dabei wurden für den angegebenen Zeitraum insgesamt eine Anzahl von 7405 Veröffentlichungen mit dem Stichworten „Chiral separation“ und der jeweiligen Trenntechnik gefunden (Tabelle 4).

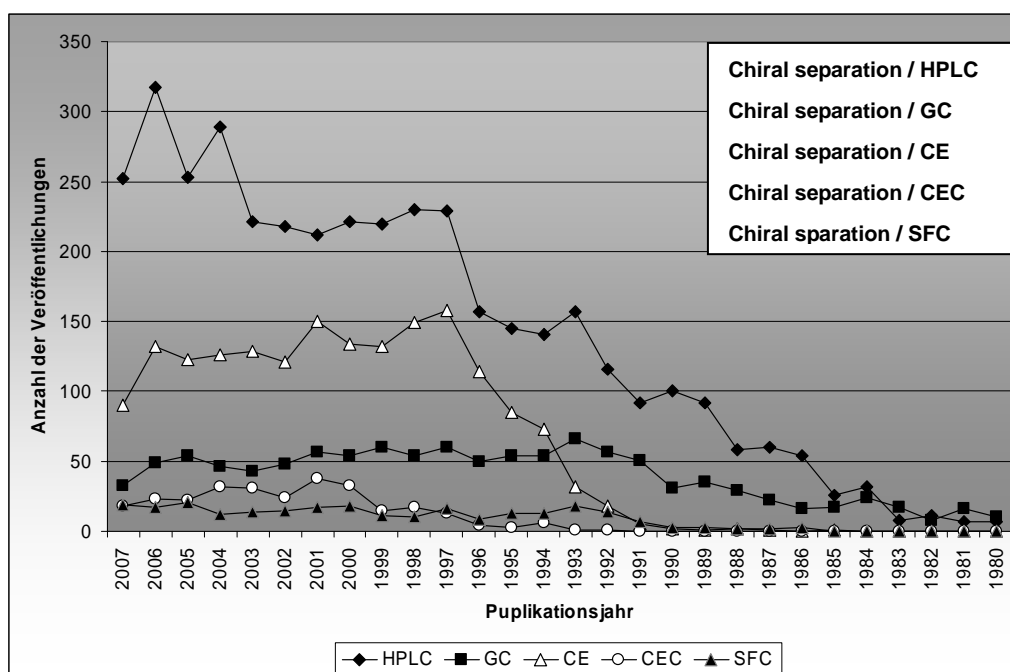


Abbildung 18: Anzahl der Veröffentlichungen über enantiomere Trennungen, aufgeschlüsselt nach den unterschiedlichen Trenntechniken in der Zeit von 1980 – 2007 (SciFinder Database)

Tabelle 4 Gesamtanzahl der Veröffentlichungen (2007 bis 1980)	
Trenntechnik	Anzahl der Veröffentlichungen
HPLC	3942 (53,2 %)
GC	1141 (15,4 %)
CE	1782 (24,1 %)
CEC	282 (3,8 %)
SFC	258 (3,5 %)
Summe	7405

Die Entwicklung einer Vielzahl von chiralen stationären Phasen (CSP; Abbildung 19) und die hohe Anzahl an Veröffentlichungen (Tabelle 4), die deren Anwendung demonstrieren, machen die HPLC zur dominierenden Technik, obwohl chirale CE-Methoden vielfältige Vorteile besitzen.

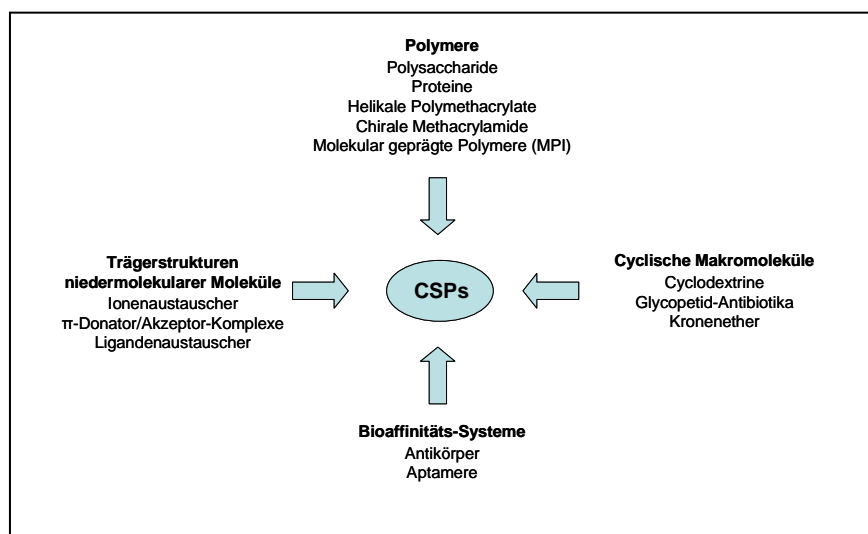


Abbildung 19: Übersicht über die Hauptklassen chiraler Selektoren, die zur Herstellung stationärer Phasen in der HPLC angewendet werden [16].

Chirale CE-Methoden bestehen gegenüber der HPLC und anderen chiralen Trenntechniken durch niedrige Durchführungskosten. Die Entwicklung kapillar-

elektrophoretischer Methoden ist zusätzlich leichter und schneller. Die Kapillaren und die chiralen Selektoren sind günstiger als aufwendig hergestellte Tenssäulen, wie sie in der HPLC zum Einsatz kommen (siehe oben). Da für die Enantiomerentrennung eine Suche nach dem optimalen chiralen Selektor nach dem „trial and error“-Prinzip unumgänglich ist, zeigt sich die Flexibilität durch die variable Zugabe möglicher Selektoren zum Trennpuffer in der CE als großer Vorteil. Neben der Zeitersparnis können so auch Probenmengen und Verbrauchsmaterialien reduziert werden. Gerade im Vergleich zur Polarimetrie sind die geringen Mengen an einzusetzendem Probevolumen interessant: In der CE werden nur wenige Mikroliter Probe benötigt. Eine weitere Überlegenheit ist die hohe Trennleistung, die die Abtrennung weiterer Verunreinigungen oder Probenbestandteile ermöglicht, und CE-Methoden eine außerordentlich hohe Selektivität beschert. Dadurch können selbst Vielstoffgemische in einer Analyse bestimmt werden. Die Gaschromatographie (GC) und die überkritische Flüssigchromatographie (SFC) profitieren ebenfalls von der Entwicklung chiraler CSPs. Mit beiden Techniken können sehr kurze Analysezeiten erreicht werden. Eine geringere Trennleistung erfordert aber auch hier einen höheren Entwicklungsaufwand und hohe Werte für die Auflösung, wie in der CE, können oftmals nicht erreicht werden. Während die GC typischerweise auf die Bestimmung von flüchtigen Stoffen und Aminosäuren beschränkt ist, steckt die SFC noch in den Anfängen der Entwicklung und scheint grade für High-throughput-Screenings ein hohes Potential zu besitzen [49]. Chirale CSPs werden auch in Kombination mit elektrophoretischen Trenntechniken eingesetzt. Die chiralen Selektoren werden dann auf der Innenseite der Kapillare (vgl. GC) immobilisiert. Dieses Hybrid zwischen Chromatographie und Elektrophorese ist die Elektrochromatographie (CEC). Abbildung 19 zeigt einen Vergleich verschiedener chiraler Trenntechniken zur Bestimmung von 1-(2-Naphthyl)ethanol.

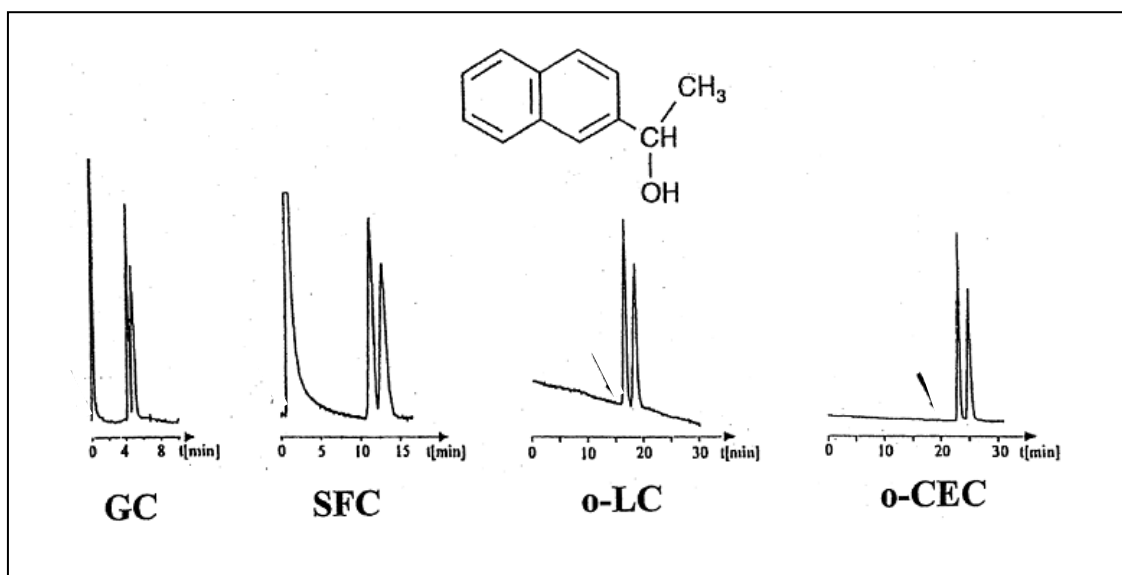


Abbildung 20: Vergleich zwischen verschiedenen chiralen Trenntechniken aus [18]. Enantiomerentrennung von 1-(2-Naphthyl)-ethanol; 100 cm x 50 μm Glaskapillare befilmt mit Chirasil-Dex 1 (0,14 μm); GC: $T = 120^\circ\text{C}$, $p = 1,1$ bar (He); SFC: $p = 68$ (CO₂), $T = 55^\circ\text{C}$; LC: $p = 0,14$ bar, $T = 35^\circ\text{C}$, 20 mM Phosphatpuffer pH 7; CEC: $U = 30$ kV, 10 mM Borat/Phosphatpuffer pH 7,5, $T = 60^\circ\text{C}$

2.4.2 Trennprinzip

In der CE wird zur Enantiomerentrennung am häufigsten die direkte Methode angewandt. Dabei werden einfach chirale Selektoren (C) im Trennpuffer gelöst. Diese bilden mit den chiralen Probemolekülen (R & S) reversible Diastereomerenkomplexe aus, die sich in ihrer effektiven elektrophoretischen Mobilität μ_{eff} (Gleichung 8) von den ungebundenen Enantiomeren unterscheiden.

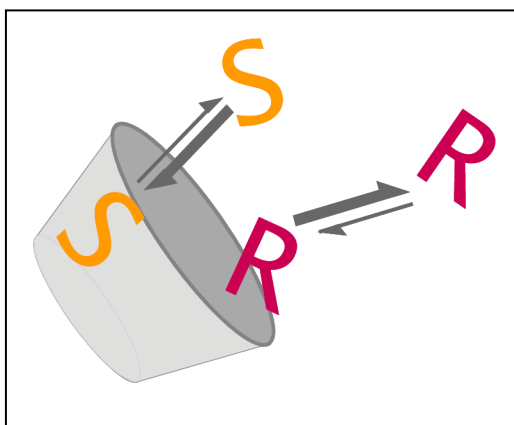
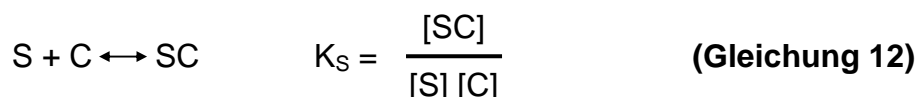
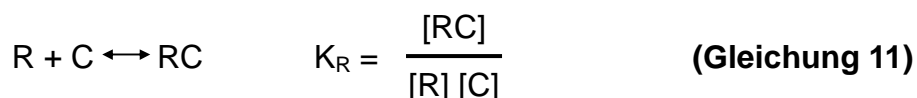


Abbildung 21: Ausbildung reversibler Diastereomerenkomplexe zwischen Enantiomerenpaar und chiralen Selektor aus [50]

Das thermodynamische Gleichgewicht dieser Komplexbildung wird durch die Komplexbildungskonstanten K_R und K_S beschrieben [51]:



Um eine effiziente Trennung des Enantiomerenpaares zu erreichen, ist der erste Schritt der Methodenentwicklung die Suche nach einem chiralen Selektor (0), der auf Antrieb zu einer Auf- oder zumindest Antrennung führt. Das ist vor allem von zwei Faktoren abhängig. Zum einen ist eine möglichst große Differenz zwischen den beiden Komplexbildungskonstanten erforderlich ($K_R \neq K_S$). Zum anderen ist Voraussetzung, dass die gebundene und freie Form im elektrischen Feld mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten migrieren [52, 53].

Bildet beispielsweise das S-Enantiomer bevorzugt Komplexe mit dem chiralen Selektor, während das R-Enantiomer kaum Interaktionen eingeht (Abbildung 21), so unterscheiden sich die Gleichgewichte von gebundener und freier Form (Gleichung 11 und 12). Im elektrischen Feld wandern die Komplexe bzw. die freien Enantiomere (je nachdem welche Spezies geladen ist; Abbildung 22A bis E) mit unterschiedlichen effektiven Mobilitäten (Gleichung 8), wodurch es zur Trennung kommt. Der beschriebene Trennmechanismus basiert letztlich auf chromatographischen Prinzipien. Die Migration der geladenen Analyten und Selektoren ist elektrophoretisch.

Abhängig von der Ladung des chiralen Selektors (C), der Ladung des Enantiomerenpaares (R & S) und der Richtung und Stärke des EOFs ergeben sich daraus die effektiven elektrophoretischen Geschwindigkeiten ($\mu_{\text{eff}}^R + \mu_{\text{eff}}^S$) der Enantiomere. Abbildung 22 zeigt eine Auswahl zugrunde liegender Trennungsmechanismen.

Mit Hilfe neutraler Selektoren (Abbildung 22A + B) lassen sich vornehmlich geladene Analyten trennen. Neutrale Selektoren besitzen keine eigene elektrophoretische

Mobilität und werden entlang des EOFs durch die Kapillare transportiert. Geladene Moleküle werden so durch Interaktionen mit neutralen Selektoren in ihrer eigenen elektrophoretischen Mobilität eingeschränkt.

Da sich der EOF auf alle Moleküle gleich auswirkt, bewegen sich basische Analyten ungebunden schneller als der Diastereomerenkomplex mit dem chiralen Selektor (Abbildung 22A). Hingegen sind saure Analyten unter den Bedingungen in Abbildung 22B negativ geladen und migrieren so entgegen dem EOF. Das bedeutet, dass sich die gebundene Form schneller durch die Kapillare bewegt.

Ein großer Vorteil der Kapillarelektrophorese gegenüber anderen, chromatographischen Trennverfahren ist die Tatsache, dass chirale Selektoren eine eigene elektrophoretische Mobilität aufweisen können (Abbildung 22C-E). Dadurch eröffnen sich in der Methodenentwicklung viele Möglichkeiten. Migriert der chirale Selektor entgegengesetzt zur Wanderungsrichtung des EOFs (Abbildung 22C), kann ein Unterschied des Gleichgewichts zwischen der gebundenen und freien Form zu großen Mobilitätsdifferenzen führen.











	<p>A</p> <p>Neutraler Selektor </p> <p>Basischer Analyt </p> <p>pH-Wert: sauer</p>
	<p>B</p> <p>Neutraler Selektor </p> <p>Saurer Analyt </p> <p>pH-Wert: alkalisch</p>
	<p>C</p> <p>Neg. gel. Selektor </p> <p>Neutraler Analyt </p> <p>pH-Wert: alkalisch</p>
	<p>D</p> <p>Neg. gel. Selektor </p> <p>Basischer Analyt </p> <p>pH-Wert: sauer</p>
	<p>E</p> <p>Pos. gel. Selektor </p> <p>Neutraler Analyt </p> <p>pH-Wert: sauer</p>

Abbildung 22: Mechanismen chiraler Trennungen in der CE

Ist in einem solchen Fall die Bindung zu dem chiralen Selektor sehr stark, kann das dazu führen, dass die zu trennenden Analyten überhaupt nicht den Detektor erreichen (Abbildung 22D). Sie werden durch den negativ geladenen Selektor in Richtung Anode transportiert. Eine Detektion kann dadurch erfolgen, dass die Polung des elektrischen Feldes getauscht wird und der Detektor am anodischen Ende der Kapillare installiert worden ist (Umkehrmodus). Das Enantiomer mit der stärksten Bindung zum chiralen Selektor wird in diesem experimentellen Aufbau als erstes detektiert.

Positiv geladene Selektoren transportieren die Analyten entlang des EOFs in Richtung Kathode (Abbildung 22E). Die Trennung kann mit normaler Polung erfolgen. Ein Problem, das bei der Verwendung positiv geladener Selektoren auftritt, ist die Adsorption der Moleküle an der negativ aufgeladenen Kapillarwand. Diese Wechselwirkung mit der Oberfläche der Kapillare kann durch die Auswahl befilmter Kapillaren verhindert werden. Dabei wird ebenfalls der elektroosmotische Fluss in der Kapillare unterdrückt. Um eine hohe Auflösung in kurzer Analysenzeit zu erreichen, können befilmte Kapillaren mit stark unterdrücktem EOF von Vorteil sein. Die Anwesenheit eines starken EOFs kann sich vor allem bei Analyten mit geringer Mobilität störend auf die Auflösung auswirken, da die eigene Mobilität der Moleküle stark überlagert wird. So bleibt zu wenig Zeit für eine ausreichende Trennung. Wandern die Analyten nur durch ihre eigene Mobilität können andererseits auch extrem kurze Kapillaren eingesetzt werden, so dass hohe elektrische Feldstärken angelegt werden können, was zu sehr kurzen Analysezeiten bei hoher Auflösung führt.

2.4.3 Chirale Selektoren

Die meisten in der Kapillarelektrophorese verwendeten chiralen Selektoren sind wasserlöslich, lassen sich einfach dem Puffer zusetzen und ermöglichen damit eine schnelle Suche nach dem optimalen Selektor mit der höchsten Trennleistung. Chirale Selektoren müssen zwei Grundvoraussetzungen erfüllen, um erfolgreich zur Enantiomerentrennung eingesetzt werden zu können (2.4.2) [35]: (i) sie müssen durch intermolekulare Wechselwirkungen stereospezifisch mit chiralen Wirkstoffen interagieren und (ii) die gebildeten Diastereomerenkomplexe müssen sich in ihrer

elektrophoretischen Mobilität vom ungebundenen Analyten unterscheiden (2.4.2). Weitere wichtige Eigenschaften sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

Tabelle 5: Eigenschaften chiraler Selektoren
Löslichkeit im BGE (meistens gut wasserlöslich)
Kompatibilität mit eingesetztem Detektor (z. B.: UV-Durchlässigkeit)
Gleichbleibende Qualität von Charge zu Charge
Günstig und kommerziell zu kaufen
Spezifizierte Stabilität bei Einlagerung
Nicht toxisch

2.4.3.1 Cyclodextrine

Cyclodextrine sind ringförmige Oligomere der Amylose. Aufgebaut aus α -(1 \rightarrow 4)-glycosidisch verknüpften Glucoseeinheiten (Abbildung 23) bilden sie eine konusförmige Gesamtstruktur aus. Die Glucoseeinheiten ordnen sich in der „Sesselform“ so an, dass die primären Hydroxylgruppen nach unten und die sekundären Hydroxylgruppen nach oben stehen.

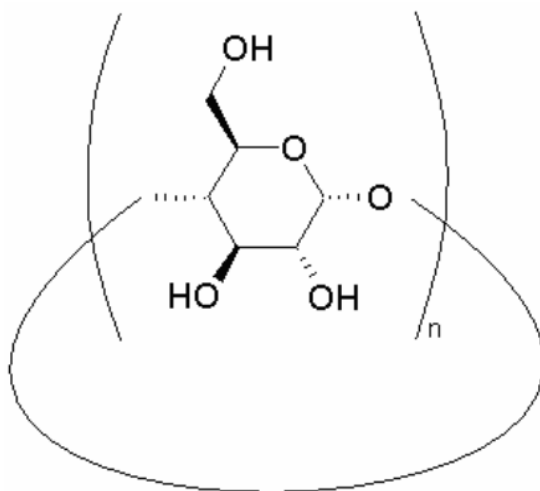


Abbildung 23: Allgemeine Struktur von Cyclodextrinen

Durch die Stellung der Hydroxylgruppen an den Rändern besteht im Inneren ein hydrophober Hohlraum (Kavität) und außen ein hydrophiler Bereich. Die Gesamtstruktur der Cyclodextrine (CDs) gleicht einem Kegelstumpf (Konus), da der Innendurchmesser auf der Seite der primären Hydroxylgruppen (unten) enger ist (Abbildung 24).

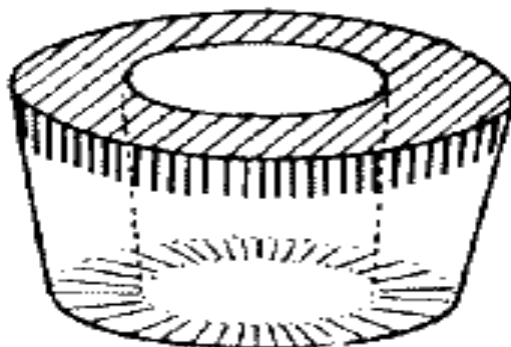


Abbildung 24: Schematische Darstellung der Struktur des CD-Moleküls: „als Konus“

Es kommt sehr leicht zu Wechselbeziehungen zwischen Kohlenwasserstoff-Ketten organischer Moleküle und dem inneren Hohlraum der Cyclodextrine, so dass sich Einschlussverbindungen bilden (Wirt-Gast Beziehung). Mit Hilfe dieser Komplexbildung können viele Effekte erzielt werden: Lösungsvermittler, Stabilisierung, Überdeckung von unangenehmen Gerüchen und bitterem Geschmack oder kontrollierte Freigabe (Retardeffekte) und vieles mehr. Entsprechend groß und vielseitig sind die Anwendungsbereiche in Landwirtschaft (z. B. Beeinflussung von Pflanzenwachstum), Textilherstellung (z. B. Aufnahme von Körpergerüchen), Technik (z. B. Verarbeitung in Abluftfiltern), Haushalt (Duftstoffe in Waschmitteln) und vor allem in der Pharmazie:

- Erhöhung der Bioverfügbarkeit schlecht wasserlöslicher Wirkstoffe
- Retardierte Freisetzung
- Verringerung von unerwünschten Arzneimittelwirkung bei i. v. Gabe
- Herstellung stabiler Zubereitungen
- Überdeckung von unangenehmem Wirkstoffgeruch und -geschmack
- Additiv in der präparativen und analytischen Chemie

Die Anwendung als chiraler Selektor in der analytischen Chemie beruht nicht allein auf hydrophoben Wechselbeziehungen mit dem Innenraum. Cyclodextrine können zusätzlich polare Bindungen über die Hydroxylgruppen am Rand der ringförmigen Moleküle eingehen (Abbildung 25).

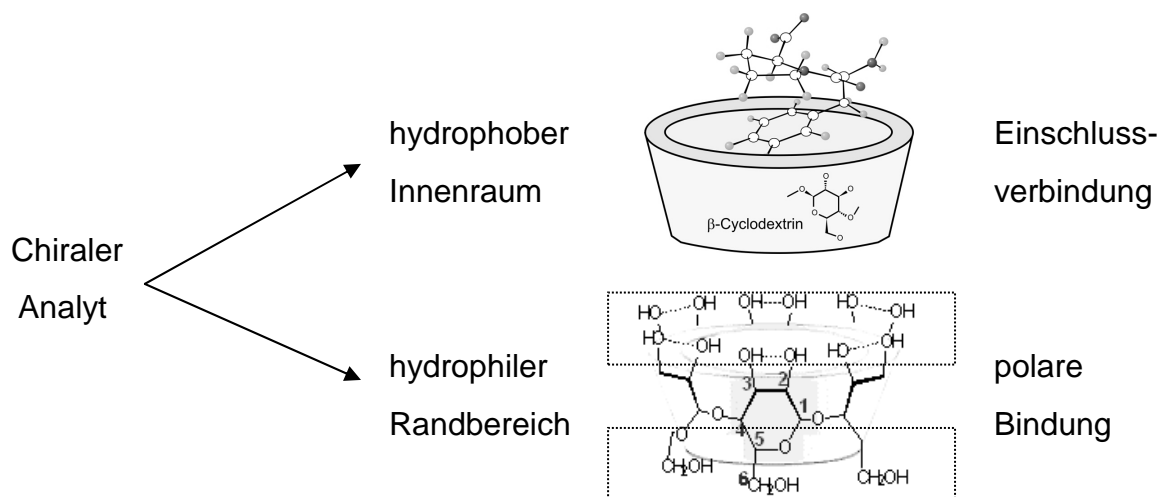


Abbildung 25: Wechselwirkungen zwischen CDs und Analyt

Die Substitution dieser Hydroxylgruppen führt nicht nur zu einem Anstieg der Wasserlöslichkeit, sondern beeinflusst zudem die Selektivität der Cyclodextrine. Somit ist die Trennleistung nicht allein von der Größe der CDs und der Anzahl der beteiligten Zuckermoleküle abhängig, sondern auch von deren Derivatisierung. Es gibt neben den wenigen nativen (unsubstituierten) Cyclodextrinen (2.4.3.1.1) eine Vielzahl synthetischer Derivate (2.4.3.1.2).

2.4.3.1.1 Natürliche Cyclodextrine

Natürliche Cyclodextrine werden durch den enzymatischen Abbau von Stärke gewonnen. Erste Publikationen, die die Isolierung der ringförmigen Zuckermoleküle beschreiben, stammen aus den 1890er Jahren [54]. Später identifizierte Schardinger drei verschiedene zyklische Oligosaccharid-Typen: alpha-, beta- und gamma-Cyclodextrine mit 6 (α -CD), 7 (β -CD) oder 8 (γ -CD) Glucoseeinheiten. Dass sich insbesondere diese Ringgrößen bilden, ergibt sich aus der Struktur des Stärkemoleküls, das durch Enzyme (Cyclodextrin-Glycosyltransferasen) abgebaut

wird. Eine Windung der Amylose-Helix besteht aus 6 bis 7 Zuckermolekülen. Höhere Homologe sind zwar synthetisch zugänglich besitzen jedoch sehr schlechte Komplexierungseigenschaften. Die Eigenschaften und physikalischen Daten der nativen Cyclodextrine sind in Tabelle 6 zusammengefasst:

Tabelle 6 Chemische und physikalische Daten der nativen Cyclodextrine [55]			
	α -CD	β -CD	γ -CD
Molare Masse [g/mol]	972	1135	1297
Anzahl der Glucose-Einheiten	6	7	8
Tiefe des inneren Holraums [nm]	0,79	0,79	0,79
Hohlraumvolumen [ml/mol]	104	157	258
Löslichkeit in Wasser [g/100 ml] bei 25°C	14,5	1,9	23,2
Spezifischer Drehwinkel $[\alpha]_D$ bei 25°C	$150,5 \pm 5$	$162,5 \pm 5$	$177,5 \pm 5$
Hydrolyse durch α -Amylase	nicht	langsam	schnell
Kristallwasser [%]	10,2	13,2 bis 14,5	8,3 bis 17,7
Wassermoleküle innerhalb des Holraums	6	11	17

Abbildung 26 zeigt die Struktur, Form und Maße der nativen Cyclodextrine

Die außergewöhnliche Form des Cyclodextrinmoleküls, wie in Abbildung 26 dargestellt, zeigen das große Potential dieser Verbindungsklasse. Trotzdem hat es über ein Jahrhundert gedauert bis Cyclodextrine den heutigen Stellenwert erreicht haben und breite Anwendung in der Pharmazie fanden. Der Grund dafür ist, dass sich lange der Fokus der Untersuchungen lange auf einen Typ beschränkte: das β -Cyclodextrin. Kosten und Verfügbarkeit, aber vor allem Eigenschaften wie die schlechte Löslichkeit in wässrigen Lösungen (Tabelle 6) und das toxische Gefährdungspotential (bei i. v.-Gabe) wurden auf alle CDs übertragen. Erst die Entwicklung und Erforschung chemisch veränderter Cyclodextrine, und die Profilierung selektiver Eigenschaften der Cyclodextrine brachten den Durchbruch in der kommerziellen Nutzung und Anwendung dieser Verbindungsklasse.

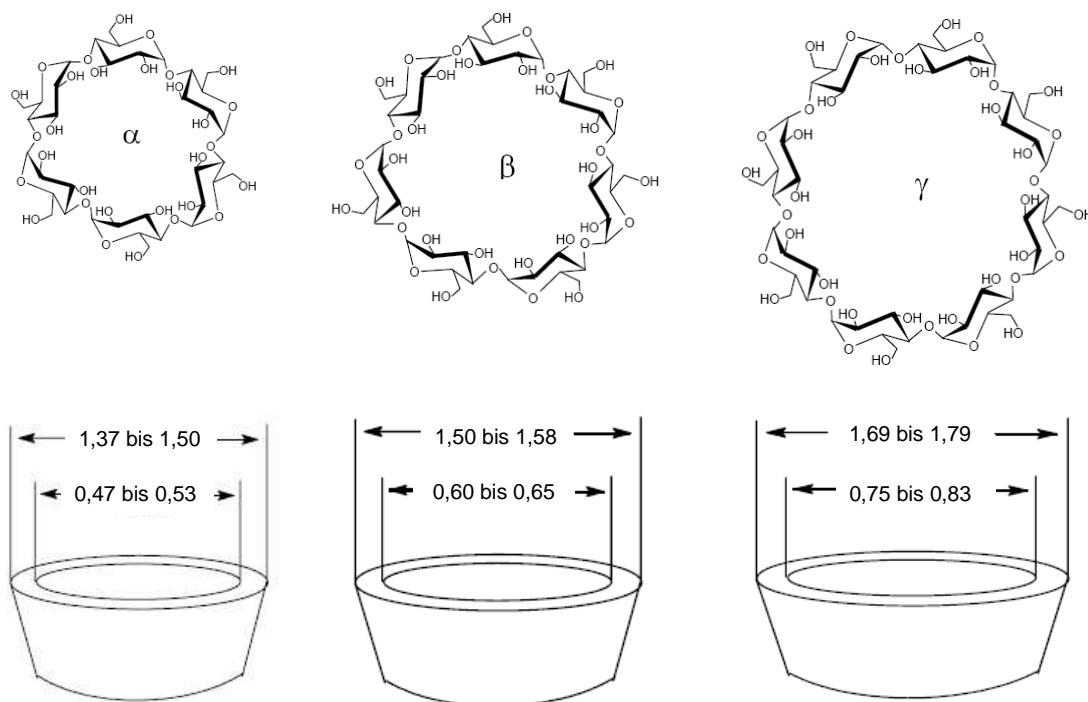


Abbildung 26: Strukturformeln und Form von α -, β - und γ -Cyclodextrin (Innen- und Außendurchmesser in [nm])

2.4.3.1.2 Substituierte Cyclodextrine

Eine Übersicht über substituierte Cyclodextrine zu geben ist aufgrund der Vielzahl der chemisch veränderten Derivate kaum mehr möglich. Schon seit Mitte der 1980er Jahre sind mehr als 1000 Derivate bekannt und deren Anwendung publiziert. Die Entwicklung der verschiedensten Derivate ist das Resultat des breit gefächerten Anwendungsgebiets der Cyclodextrine. Die Diversität dieses Spektrums und die Spezialisierung auf das jeweilige Anforderungsprofil brachten diese Vielzahl an Variationen hervor.

Bei der Weiterentwicklung der Cyclodextrinderivate zum Einsatz als Selektoren stand die Verbesserung der Selektivität und der Trennleistung chiraler Bestimmungen im Vordergrund.

Die geringe Wasserlöslichkeit begrenzte den Einsatz hoher Cyclodextrinkonzentrationen. Die Substitution der Hydroxylgruppen - auch bei hydrophoben Substituenten - führt zu einem deutlichen Anstieg der Wasserlöslichkeit.

Durch die Einführung ionisierbarer Gruppen konnte man neue Einsatzmöglichkeiten erreichen, die den Anwendungen der Mizellaren elektrokinetischen Chromatographie ähnlich sind (2.3). Funktionelle Gruppen wie Amino-, Carboxyl-Derivate oder Sulfonate, die bei entsprechendem pH-Wert der Pufferlösung ionisiert vorliegen, verleihen dem chiralen Selektor eine eigene elektrophoretische Mobilität. Damit war die Trennung neutraler Moleküle mit geladenen Cyclodextrinen möglich (Abbildung 22C und E). Die Abhängigkeit vom pH-Wert, ob eine protonierte oder deprotonierte, d.h. ionisierte oder nichtionisierte Form vorliegt, bedeutet eine starke Beeinflussung der Selektivität und der Migrationsreihenfolge der Analyten. Durch Mehrfachladungen am Cyclodextrin sind auch Ionenpaarmechanismen möglich, die zu hohen Affinitäten zwischen Analyt und chiraalem Selektor führen (Abbildung 22D).

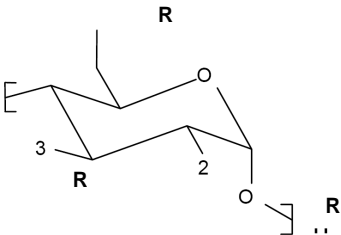
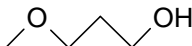
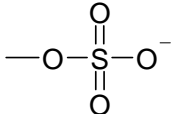
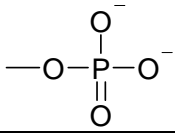
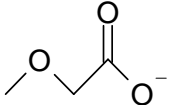
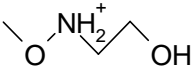
In den allermeisten Fällen reagieren die Hydroxylgruppen zu Estern oder Ethern. Tabelle 7 zeigt eine Auswahl substituierter Cyclodextrine.

Die Präfixe "Hexakis-" (6), "Heptakis-" (7) (siehe Tabelle 7) und "Octakis-" (8) lassen erkennen, um welchen Cyclodextrintyp (α -, β - oder γ -CD) es sich handelt. Allerdings werden sie in der Literatur und von den Herstellern nicht durchgehend in der Nomenklatur der Cyclodextrine verwendet.

Früher waren die meisten Cyclodextrinderivate Mischungen aus verschiedenen stark substituierten Derivatisierungsprodukten. So konnte für jede Charge nur der durchschnittliche Derivatisierungsgrad angegeben werden. Unterschiede zwischen einzelnen Chargen machen die Reproduzierbarkeit von Trennungen unmöglich. Deshalb ist heute das Ziel der Entwicklung die Herstellung isomerenreiner Cyclodextrine, deren Monozucker alle gleichartig substituiert sind.

Eine Alternative ist die Bevorratung mit einer Charge des chiralen Selektors in ausreichender Menge. Das bedeutet, dass die Entwicklung der Methode, die Validierung und die Anwendung in der Routineanalytik mit derselben Charge durchgeführt werden kann. Dafür ist eine penible Mengen- und Zeitplanung und eine begleitende Stabilitätsanalytik erforderlich, die die Qualität der Cyclodextrincharge während des gesamten Einsatzes der Bestimmungsmethode garantiert. Strategien zur Versuchsplanung und Bestimmungsmethoden zur Quantifizierung von

Cyclodextrinen und möglichen Verunreinigungen werden in Kapitel 6.1.4 ausführlich diskutiert.

Tabelle 7 Substituierte Cyclodextrine	
<p>Allgemeiner Aufbau:</p> <p>R = Rest</p> <p>n = 6: α-CD; n = 7: β-CD;</p> <p>n = 8: γ-CD</p>	
	
Neutrale Cyclodextrine	
Name	R (Rest)
Heptakis(2,3,6-tri-O-methyl)- β -CD (TM- β -CD)	$-\text{OCH}_3$
Hydroxylpropyl- β -CD (HP- β -CD)	
Negativ geladene Cyclodextrine	
Name	R (Rest)
Sulfatiertes- α -CD (S- α -CD); oder β -/ γ -CD	
Phosphatiertes- α -CD; oder β -/ γ -CD	
Carboxymethyl- β -CD (CM- β -CD)	
Positiv geladene Cyclodextrine	
Name	R (Rest)
Mono(6-deoxy-6-ethylamino)- β -CD (QA-CD)	

2.4.3.1.3 Komplexbildung

Für die Ausbildung eines Komplexes zwischen Cyclodextrin als Wirtsmolekül und einem Gastmolekül sind intermolekulare Wechselwirkungen verantwortlich. Es handelt sich dabei vor allem um van-der-Waals-Kräfte, hydrophobe Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen. Diese Wechselwirkungen können so ausgeprägt sein, dass sie der Intensität einer kovalenten Bindung entsprechen. Die treibende Kraft der Komplexbildung ist das Auswechseln von Wassermolekülen gegen hydrophobe Molekülketten des Gastmoleküls. Durch die entstehenden Wechselwirkungen sinkt die Ringspannung und ein stabilerer Zustand wird erreicht. Die Trennung beruht auf unterschiedlichen Aufenthaltszeiten der Analyten im Cyclodextrin, die auf unterschiedlicher Stabilitätskonstanten (Komplexbildungskonstanten; Gleichung 11 und 12) zurückzuführen sind. Eine Vorhersage der Trennleistung eines Cyclodextrins lässt sich aber auch bei Kenntnis der Struktur des zu bestimmenden Analyten nur schwer treffen. Die Ausbildung stabiler Wirt-Gast-Komplexe korreliert nicht mit einer hohen Trennleistung, sondern hängt von der Selektivität des Cyclodextrins gegenüber den beiden Enantiomeren ab. Die Selektivität und damit die Mobilitätsunterschiede sind neben der Komplexbildungskonstanten überwiegend von der Cyclodextrin-Konzentration und den Mobilitätsunterschieden im komplexierten und nicht komplexierten Zustand des Analyten abhängig (2.4.2).

Mit zunehmendem Derivatisierungsgrad steigt der Einfluss der funktionellen Gruppen am Rand der Cyclodextrin-Moleküle (Abbildung 25). Die Art und Stärke dieser Wechselwirkungen sind weitere Parameter, die einen Einfluss auf die Migrationgeschwindigkeit ausüben. Mit ionischen Cyclodextrinen sind auch Ionenpaarmechanismen möglich, die zu einer veränderten Selektivität und Migrationsreihenfolge führen können (2.4.3.1.2).

Neben Cyclodextrinen gibt es eine Reihe weiterer chiraler Selektoren, die die Eigenschaften aus Tabelle 5 aufweisen und für enantiomere Bestimmungen eingesetzt werden.

2.4.3.2 Kronenether

Als weitere wichtige Selektoren sind zunächst die Kronether zu nennen, bei denen es sich ebenfalls um zyklische Verbindungen handelt. Wie Abbildung 27 zeigt, handelt es sich um makrozyklische Polyether, die mit diversen anorganischen Kationen Komplexe bilden. Mit organischen Molekülen werden die Wechselbeziehungen bevorzugt über Aminogruppen ausgebildet, die im Analytmolekül erforderlich sind (Aminosäuren, Proteine geringer Molmasse oder auch Arzneistoffe, wie z. B. DOPA). Es wird davon ausgegangen, dass sich zwischen der protonierten Aminogruppe und den Sauerstoffatomen des Kronether-Rings Wasserstoffbrücken ausbilden (Abbildung 27) [56].

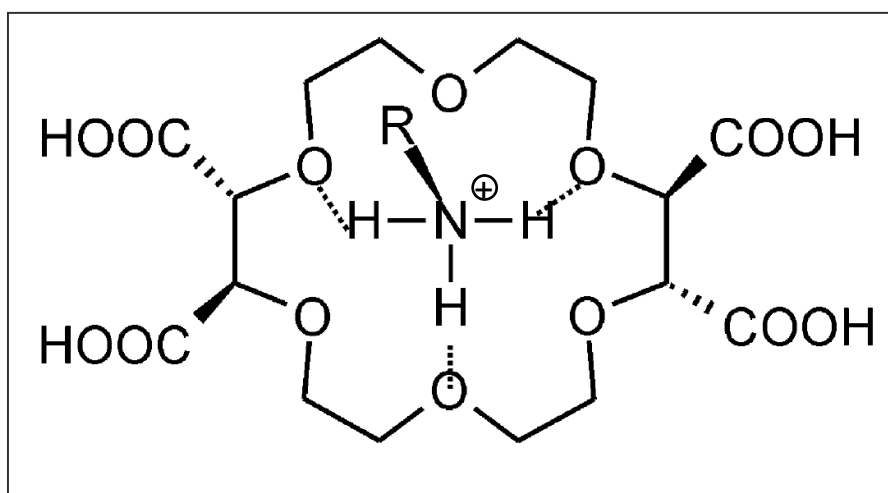


Abbildung 27: Komplex zwischen primärer Aminogruppe und 18C6H4 [(+)-(18-Kron-6)-2,3,11,12-tetra-carboxyl-säure] aus [57]

2.4.3.3 Lineare Oligo- und Polysaccharide

Neben zyklischen Kohlenhydraten werden auch lineare Oligo- und Polysaccharide als chirale Selektoren in der CE eingesetzt [58, 59]. Sie sind aus Einfachzuckern aufgebaut, die durch verschiedene Bindungen (zum Beispiel α -(1-4), α -(1-6) oder β -(1-3)) verknüpft sind. Dabei können sich auch spiralförmige oder helikale Strukturen ausbilden, in die sich Analytmoleküle einlagern. Die unterschiedlichen Positionen der Monosaccharideinheiten haben dabei direkten Einfluss auf die Enantioselektivität der

Glykane. Aufgrund schwächerer hydrophober Wechselwirkungen mit den Analytmolekülen bilden sich nicht so stabile Diastereomerenkomplexe aus wie mit Cyclodextrinen. Man kann zwischen zwei Gruppen unterscheiden, den neutralen und geladenen Kohlenhydraten [60, 61]. Bei ionischen Kohlenhydraten spielen elektrostatische Wechselbeziehungen die größere Rolle [62].

2.4.3.4 Makrozyklische Antibiotika

Makrozyklische Antibiotika werden erfolgreich zur Trennung von Analyten mit sehr unterschiedlicher Struktur verwendet. Dabei ist der genaue Mechanismus des Trennvorgangs nicht eindeutig geklärt. Makrozyklische Antibiotika umfassen zum einen die so genannten Ansa-Verbindungen (ansa lat.: Henkel). Diese makrozyklischen Cyclophane bilden röhrenartige Strukturen, die kleinere Moleküle aufnehmen können. Zum anderen gehören die Glycopeptid-Antibiotika in diese Verbindungsklasse, die eine sehr hohe Trennleistung und Enantioselektivität aufweisen. Die Interaktionen zwischen den Selektoren und Analyten, die die Einlagerung in hydrophobe Hohlräume, Dipol-Dipol-Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen oder auch π - π -Interaktionen beinhalten, basieren auf unterschiedlichsten Strukturelementen, die aber beiden Antibiotika-Gruppen gemein sind: (i) Chirale Zentren, (ii) Aromatische Ringe, (iii) Enantioselektive Zentren (Hohlräume) und (iv) Ionisierbare Gruppen, mit direktem Einfluss auf chirale Selektivität und Migrationsgeschwindigkeit [57]. Trotz ihrer breiten Anwendungsmöglichkeiten, kommen makrozyklische Antibiotika noch immer selten zum Einsatz, da sie gegenüber anderen chiralen Selektoren gravierende Nachteile aufweisen. Sie besitzen im UV-Vis-Bereich eine hohe Eigenabsorption, aufgrund der im Molekül enthaltenen Chromophore (aromatische Ringe). Außerdem sind sie chemisch instabil und vor allem Glycopeptide sehr temperaturempfindlich. Sie werden oft an der Kapillarwand adsorbiert und sind sehr teuer [63]. Substanzbeispiele sind Rifamycin (Ansa-Verbindung), Vancomycin und Ristocetin A (beide Glycopeptide) [57, 63].

2.4.3.5 Andere Chirale Selektoren

Es gibt eine Reihe weiterer chiraler Selektoren, die in der Kapillarelektrophorese eingesetzt werden. Wobei kein chiraler Selektor so häufig verwendet wird wie Cyclodextrine [43] (Abbildung 28).

Abgeleitet von der MEKC (2.3) werden oberflächenaktive Stoffe für chirale Trennungen eingesetzt [64], wie z. B. Tenside, die optisch aktiv sind. Zusätzlich kann dem Trennpuffer ein chiraler Selektor zum verwendeten Tensid zugesetzt werden [65].

Nach erfolgreichem Einsatz als chirale Selektoren in der HPLC haben Proteine auch Einzug in die CE gehalten (Sonderfall der Affinitätskapillarelektrophorese). Die hohe Absorption im UV-Vis-Bereich und die Adsorption von Proteinen an der Kapillarwand erschweren allerdings die Methodenentwicklung und die Leistungsfähigkeit chiraler Trennmethode mittels Proteinen.

Bei der chiralen Ligandenaustausch-Kapillarelektrophorese wird zunächst ein Chelatkomplex (Zentralion: Kupfer, Nickel oder Zink) mit mindestens zwei chiralen Liganden (typischerweise L-Aminosäuren) gebildet, die zum Trennpuffer hinzugegeben werden [66]. Die Analytmoleküle verdrängen einen der Liganden aus dem Komplex. Die Auftrennung erfolgt aufgrund der Stabilitätsunterschiede der gebildeten Komplexe mit dem R- oder S-Enantiomer. Die Anwendung ist auf chirale Moleküle mit funktioneller Gruppe beschränkt, die in der Lage sind, Wechselwirkungen zur Komplexbildung einzugehen (z. B. Amino- oder Hydroxysäuren). Gravierende Nachteile dieser Methode sind auch hier die schlechte Detektierbarkeit wegen der hohen Eigenabsorption der Chelatkomplexe und eine geringe Trennleistung, da sich viele Gleichgewichte der Komplexbildung nur langsam einstellen.

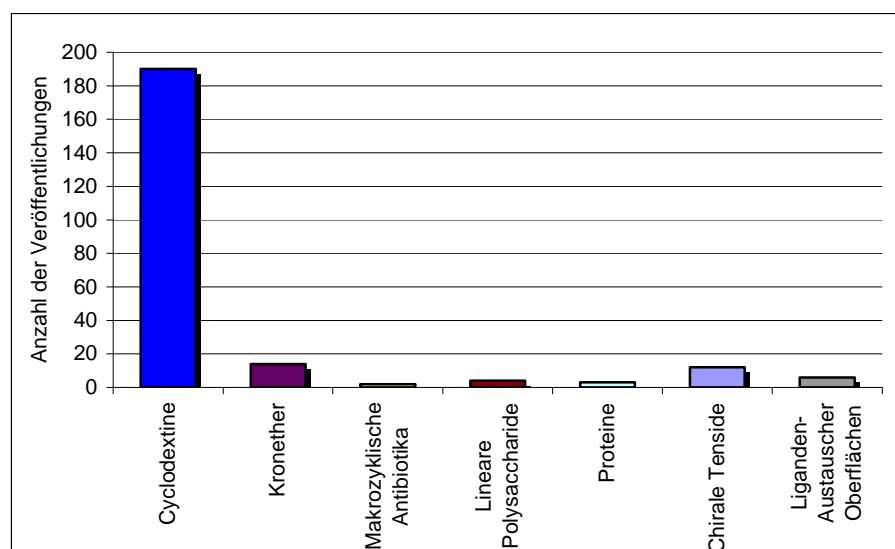


Abbildung 28: Häufigkeit des Gebrauchs chiraler Selektoren in der CE von 2000 bis 2007 (SciFinder Database)

3 Methodenvalidierung

Um analytische Methoden in der Qualitätskontrolle von Arzneistoffen und Arzneiformulierungen anzuwenden, müssen diese validiert werden. „Fitness for use“ stellt auch aus Behördensicht die Grundlage für den routinemäßigen Einsatz von qualitativen und quantitativen Bestimmungen und Reinheitsprüfungen dar. Je nach Anforderung an die Methode und die analytische Fragestellung wird die Validierung entlang spezifischer Validierungsparameter (Anhang 1) ausgerichtet (Tabelle 8).

Tabelle 8 Anforderungen an analytische Methodenvalidierung [67]				
Validierungsparameter (Anhang 1)	Analytische Fragestellung			
	Identifizierung	Reinheitsprüfung		Gehalt
		quantitativ	Grenzprüfung	
Richtigkeit	-	+	-	+
Präzision	-	+	-	+
Wiederholpräzision	-	+	-	+
Intermediate Precision	-	+(1)	-	+
Selektivität (2)	+	+	+	+
Nachweisgrenze (DL)	-	-(3)	+	-
Bestimmungsgrenze (QL)	-	+	-	-
Linearität	-	+	-	+
Arbeitsbereich	-	+	-	+

“-”: Nachweis ist nicht erforderlich

“+”: Nachweis ist erforderlich

- 1) Wenn der Nachweis der Vergleichspräzision geführt würde, entfällt Intermediate Precision.
- 2) Der Nachweis der Selektivität kann auch durch weitere analytische Methoden erbracht werden.
- 3) Bei einigen quantitativen Reinheitsprüfungen erforderlich [68].

Die vier analytischen Kategorien aus Tabelle 8 entsprechen den Vorgaben aus der ICH-Guideline Q2 (R1) [67]. Die amerikanische Gesundheitsbehörde hat in Anlehnung an das amerikanische Arzneibuch zusätzlich eine Richtlinie „Validation of Compendial Methods“ [69] implementiert. Guidelines und Arzneibücher geben aber nur einen sehr weit gefassten Rahmen vor, um die Anwendung auf viele Methoden zu ermöglichen. Die Planung und Durchführung der Validierung im Detail gehört zu den Aufgaben des verantwortlichen Analytikers.

Vor der Validierung werden kritische Geräte- und Methodenparameter in einer Risikoanalyse beschrieben und bewertet. Die Anforderungen der Methodenvalidierung müssen entlang der analytischen Fragestellung ausgerichtet sein (Abbildung 29). Kritische Parameter und ihr Einfluss lassen sich aus den Erfahrungen, die bei der Entwicklung einer Methode gesammelt werden, ableiten. In Anhang 2 sind wichtige Aspekte und Methodenparameter der Kapillarelektrophorese zusammengefasst [70-72]. Je früher die beschriebenen Validierungsparameter bei der Methodenentwicklung berücksichtigt werden, desto sicherer kann eine zielgerichtete Entwicklung zum Erfolg gebracht werden. Können die Anforderungen der Validierung nicht erfüllt werden, muss die Methode optimiert und die Validierung wiederholt werden (Abbildung 29). Eine Revalidierung einer analytischen Methode ist gemäß ICH Guideline Q2 (R1) [67] auch erforderlich, wenn eine relevante Änderung (Risikobetrachtung erforderlich) in der Herstellung des zu untersuchenden Probenobjekts (Synthese des Wirkstoffs oder die Zusammensetzung der Formulierung) oder der analytischen Methode vorliegt.

Vor der Methodenvalidierung muss die Geräteausrüstung qualifiziert werden [73]. Eine systematische Inspektion aller relevanten Geräteparameter sollte halbjährlich wiederholt und dokumentiert werden. Dazu eignen sich Standardmethoden mit bekannten Leistungsparametern wie Migrationszeiten und das Signal/Rausch-Verhältnis [74, 75]. Möglich ist aber auch die kontinuierliche Auswertung von Daten, die zu jeder Zeit Aussagen über die Instrumentelle Qualifizierung erlauben (Ongoing Performance Qualification). Veränderungen in den Ergebnissen lassen sehr einfach Rückschlüsse auf defekte Geräteteile und Wartungsbedarf zu. Außerdem ist die tägliche Kontrolle der Funktionsfähigkeit des Systems (SST) Bestandteil eines umfassenden Qualitätssicherungs Management Systems.

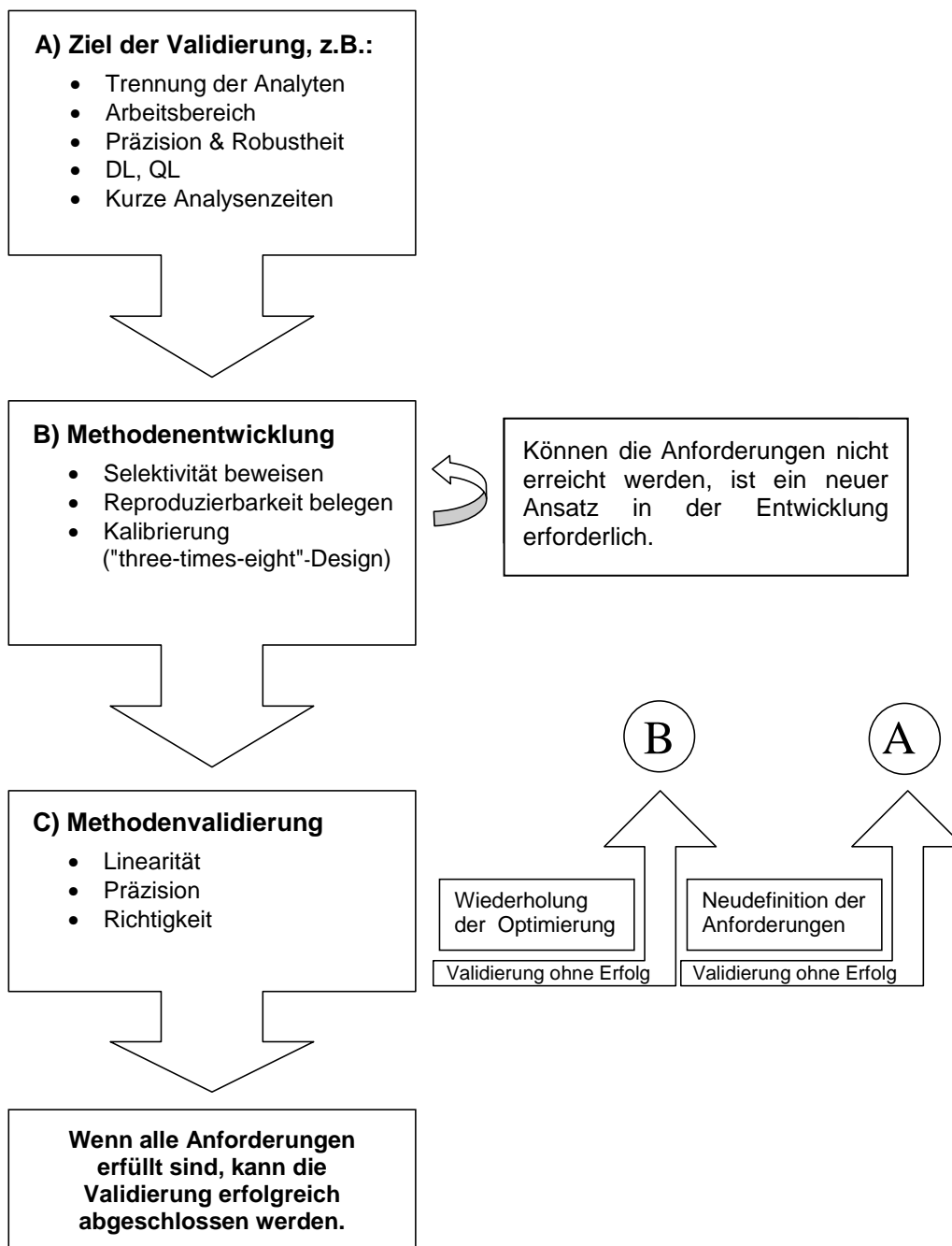


Abbildung 29: Validierungskonzept

4 Verwendung Interner Standards in der MEKC

4.1 Allgemeine Grundlagen

In vielen Leistungsparametern ist die Kapillarelektrophorese klassischen chromatographischen Trennverfahren überlegen. Vorteile, wie die hohe Trennleistung, kurze Analysenzeiten, flexible und effiziente Methodenentwicklung haben die CE einem breiten Anwendungsspektrum zugänglich gemacht. Um aber die hohen Präzisionswerte von HPLC- und GC-Methoden ($RSD\% \ll 1\%$) zu erreichen, ist der Einsatz Interner Standards (IS) erforderlich [76]. Insbesondere wenn eine unpräzise Injektion die Hauptfehlerursache ist, kann durch den Einsatz Interner Standards das Leistungsvermögen quantitativer CE-Methoden verbessert werden.

Kurze Injektionszeiten und geringe Drücke bei der heute hauptsächlich angewendeten hydrodynamischen Injektion (Abbildung 6) haben kurze Probenzonen (P_z ; Gleichung 2) und große relative Fehler als Konsequenz. Diese Fehlerquelle kann durch den Zusatz einer Internen Standardsubstanz ausgeglichen werden. Weitere Parameter, die die Präzision beeinträchtigen und die durch die Verwendung Interner Standards kompensiert werden können, sind in Tabelle 9 gelistet.

Tabelle 9 Einflussfaktoren auf die Präzision [7, 76]
Temperaturschwankungen
Verdunstung von Probenlösung aus dem Vial
Druckschwankungen während der Injektion
Höhenunterschiede der Flüssigkeitsstände in den Puffervials
Viskositätsunterschiede der Lösungen
Nicht reproduzierbare Injektionssequenz
Schwankungen der Migrationszeiten
Kurze Probenzone / Kurze Injektionszeit
Proben-Verschleppung

Definitionsgemäß ist die Substanz, die als Interner Standard verwendet wird, eine probenfremde Komponente. Sie wird in bekannter Konzentration zur Probenlösung und Referenzlösung hinzugegeben. Der Interne Standard dient somit als relative Bezugsgröße. Verändert sich die Fläche des IS-Peaks, wird davon ausgegangen, dass sich die Peakflächen der Analyten in gleicher Weise ändern. Daher kommt der Auswahl des Internen Standards eine entscheidende Bedeutung zu.

4.2 Anforderungen an Interne Standards

Die Verwendung Interner Standards ist einfach und bedarf kaum zusätzlicher Vorbereitung und Zeit beim Herstellen der Proben- oder Referenzlösungen. Damit eine Substanz die Präzision einer analytischen Methode deutlich erhöht, muss sie folgenden Anforderungen entsprechen (Tabelle 10).

Tabelle 10 Erforderliche Substanzeigenschaften von IS
Allgemein
Unempfindlich und stabil im gelöstem Zustand
Hoher Responsefaktor (Hohe UV-Absorption)
In höchstem Reinheitsgrad erhältlich
Gleichbleibende Qualität
Günstig und kommerziell lange verfügbar
Gut charakterisiert
nicht toxisch

Methoden und Proben spezifisch
Ähnliche physikalische und chemische Eigenschaften
Ähnliche Verteilungsverhältnisse der Atome/Moleküle
Migrationszeit innerhalb der Analysenzeit
Zeitnahe Migration zu relevanten Probenpeaks
Kein ursprünglicher Probenbestandteil
Simultan bestimmbar mit der gleichen Methode wie die Probe (Selektivität)
Gute Lösbarkeit im Probenlösungsmittel

Die zeitnahe Migration des IS zu relevanten Probenpeaks ist in der Kapillarelektrophorese ein wichtiger Schritt während der Methodenentwicklung. Durch die Auswahl des richtigen Internen Standards kann so der Einfluss schwankender Migrationszeiten kompensiert werden (2.1.1.2). Die absoluten Peakflächen (AU_{abs}) werden dabei direkt auf die Peakflächen des Internen Standards bezogen (5.4). Der Migrationszeitpunkt ist in der MEKC dabei nicht so einfach vorhersagbar (2.3) wie in der CZE (4.4).

4.3 Verbesserung der Leistungsmerkmale von CE-Methoden durch Verwendung von Internen Standards

Die in Tabelle 9 aufgeführten Einflussfaktoren können die Präzision einer CE-Methode deutlich verschlechtern. Durch den Einsatz eines Internen Standards können die Einflüsse gemindert oder sogar komplett eliminiert werden [7, 71].

Die Viskosität der Probenlösung ist temperaturabhängig. Deshalb ist die Methodendurchführung bei konstanter Temperatur Voraussetzung für reproduzierbare Injektionsvolumina. Auch Hilfsstoffe der Arzneimittelformulierung beeinflussen die Viskosität der Probenlösung. Die Referenzlösung muss mit der Probenlösung abgeglichen werden. Ist die hergestellte Probenlösung z. B. aus einer Tablette deutlich viskoser, sinkt das Injektionsvolumen. Der Aufwand, die

Eigenschaften der Referenzlösung durch Herstellung einer Probenmatrix (Placebo) anzugleichen, kann durch den Zusatz des Internen Standards umgangen werden. Die unterschiedlichen Viskositäten wirken sich auf die relativen Peakflächen (AU_{rel} ; Gleichung 13) nicht aus.

$$AU_{rel} = \frac{AU_{abs} \text{ (Probe)}}{AU_{abs} \text{ (IS)}} \quad \textbf{(Gleichung 13)}$$

AU_{rel} : relative Peakfläche (bezogen auf Internen Standard)

AU_{abs} : absolute Peakfläche

Auch Fehler, die durch Verdunstung der Probenlösung aus den Vials oder Verschleppung der Probe (z. B. durch Abtropfen von Kapillarinhalt nach erfolgter Injektion) zu einem Rückgang der Präzision führen, beeinflussen die relativen Peakflächen nicht, denn sowohl die Konzentration der Analyten als auch die des Internen Standards werden dabei in gleicher Weise verändert.

Injektionsungenauigkeiten, seien sie gerätebedingt (Druckschwankungen, unpräzise Injektionssysteme) oder methodenbedingt (kurze Injektionszeit) können ebenso reduziert werden wie die Folgen von Höhenunterschieden der Flüssigkeitsstände in den Puffervials (Siphoneffekt).

4.4 Unterschiede zwischen den Bedingungen in der CZE und MEKC

Der erfolgreiche Einsatz eines Internen Standards ist entscheidend von der Migrationszeit der gewählten Substanz abhängig (4.2). Die Verbesserung der Leistungsparameter, wie die Präzision (4.3), gelingt nur, wenn sich die Schwankungen in der Durchführung der Methode (Tabelle 9) und Veränderungen von Umgebungseinflüssen auf die Probe und den Internen Standard gleich auswirken. Dafür sollten sich möglichst die chemischen und physikalischen Eigenschaften beider Komponenten ähneln, damit sie sich während der Analyse gleich verhalten und in direkter Nachbarschaft nah zu einander migrieren. Dabei sollte der zugesetzte

Standard möglichst vor dem letzten relevanten Peak im Elektropherogramm erscheinen, um die Analysenzeit nicht zu verlängern.

Eine Voraussage und sichere Abschätzung des Migrationszeitpunktes ist für die Auswahl und Eignung eines Internen Standards wichtig und Voraussetzung für eine schnelle und effiziente Methodenentwicklung. In der Kapillarzonenoelektrophorese (CZE) ist eine Vorhersage des Migrationszeitpunktes anhand der Struktur der Substanz möglich, da die Migrationszeit direkt von der Größe und der Ladung des Moleküls abhängt. Standardsubstanzen aus der CZE können aber in der mizellaren elektrokinetischen Chromatographie (MEKC) häufig nicht angewendet werden. Der Zusatz von anionischen Tensiden (überwiegend SDS) in der MEKC (2.3) und der Einfluss der sich ausbildenden Mizellen [77] auf die Migration ist weitaus komplexer. Die Wanderungsgeschwindigkeit (v_i ; Gleichung 6) der Analyten und des Internen Standards ist nicht alleine von der eigenen elektrophoretischen Mobilität (μ_{eff}) und dem EOF (μ_{EOF}) abhängig, sondern wird zusätzlich durch die Wechselwirkungen mit den Mizellen (Abbildung 16) beeinflusst. Die an der Oberfläche negativ geladenen Mizellen gehen mit kationischen Substanzen, die in der CZE erfolgreich als Standardsubstanzen zugesetzt werden, sehr intensive Interaktionen ein. Dadurch migrieren positiv geladene Substanzen in der MEKC sehr spät und somit ist die Verwendung als Interner Standard ungünstig.

Durch die Komplexität und diverse Einflüsse auf die Migration der Analyten und Internen Standardsubstanzen in der MEKC wird die Auswahl einer geeigneten Substanz schwieriger und die Methodenentwicklung aufwendiger. Das Ziel der Untersuchungen war die Charakterisierung und Auswahl von geeigneten Substanzen zur Verwendung als Interner Standard für zukünftige Methodenentwicklungen in der MEKC.

4.5 Untersuchung von Substanzen zum Einsatz als Interne Standards in der MEKC

4.5.1 Einleitung

Um schnell und effizient einen geeigneten Internen Standard für MEKC-Methoden zu finden, ist es erforderlich die Eigenschaften der Substanzen gut zu kennen. Je größer

das Migrationszeitfenster ist, das durch die Auswahl aller charakterisierten Substanzen abgedeckt wird, desto breiter ist das Anwendungsspektrum. Dabei sollte jede einzelne Substanz gut charakterisiert sein, um gezielt eine Entscheidung treffen zu können. Die Untersuchungen dieser Arbeit umfassen die Migrationszeit (t_R), die relative Migrationszeit ($t_R - t_0$) und den Kapazitätsfaktor (k_S), um die Substanzen nach ihrer Migrationszeit zu ordnen und die Auswahl einer geeigneten Substanz bei geringem Entwicklungsaufwand treffen zu können. Es konnte gezeigt werden, dass sich vor allem der Kapazitätsfaktor, aber auch die von der Migrationszeit abhängige Reihung der Substanzen auf andere MEKC-Methoden übertragen lassen (5.5.2). Die Auswahl von Standardbedingungen, die von S. Terabe publiziert wurden [78] und in Tabelle 11 beschrieben sind, begünstigen die Übertragbarkeit der Ergebnisse.

Tabelle 11 Methode zur Charakterisierung der IS Substanzen	
IS-Standardmethode	
Kapillare	50 μm (I.D.) x 60 cm (l_{ges}) [48 cm (l_{det})]
Trennpuffer (8.5.1.3)	50 mM Boratpuffer
	30 mM SDS pH 8,5
	5,0 % MeOH
Spannung	+ 20 kV
Injektion	50 mbar, 18 sec
Detektion	218 nm

Weitere Substanzinformationen sind zusammengestellt worden, um eine effiziente Auswahl des Internen Standards treffen zu können. Die Angabe der Absorptionsmaxima (Tabelle 13) und die UV-Spektren (Anhang 3) ermöglichen den Abgleich mit gemessenen Detektionswellenlängen der Analyten und die Suche nach einem geeigneten Wellenlängenbereich. Anhand der Struktur können weitere physikalische und chemische Eigenschaften mit der Probe verglichen werden.

4.5.2 Auswahl der Substanzen

Grundlage für die Zusammenstellung der Substanzen, die untersucht worden sind, war eine SciFinder-Datenbankrecherche [79]. In drei voneinander unabhängigen Recherchen ist nach den Schlüsselwörtern „Internal Standard in MECC/MEKC“ gesucht worden. Weitere verwendete Suchbegriffe waren „CE“, und „IS“. Der Abgleich aller Suchvorgänge, die im Februar 2006 durchgeführt wurden, ergab 60 Literaturstellen mit MEKC-Methoden, die die Verwendung eines Internen Standards beschreiben. Bei der Auswertung der Literatur konnten zunächst 30 verschiedene Substanzen gezählt werden. Von diesen wurden in dieser Arbeit 23 berücksichtigt. Weitere Substanzen werden in Tabelle 12 gelistet.

Tabelle 12 Nicht berücksichtigte IS-Substanzen	
2-Desoxy- <i>D</i> -ribose	[80]
6-O-Methyl-guanin	[81]
Glucotropaeolin	[82]
Homoarginin	[83]
3-Pyrrolidinol	[84]
Ranitidinhydrochlorid	[85]
Scopolamin-N-oxidhydrobromid	[86]

Diese Substanzen sind nach der Betrachtung und Auswertung der Literaturstellen bei den weiteren Untersuchungen aus unterschiedlichen Gründen nicht berücksichtigt worden. Zum Teil waren die Methodenbeschreibungen zu wenig ausführlich und ungenau oder mit zu wenigen Daten belegt (ohne Methodvalidierung), oder der Nutzen des verwendeten Standards konnte nicht immer ausreichend belegt werden. Substanzen, die kommerziell nicht erhältlich oder sehr teuer waren, fielen auch aus der IS-Auswahl heraus. Im Fall von z. B. 2-Desoxy-*D*-ribose handelte es sich um sehr

spezielle Trennprobleme mit individuellen Anforderungen an die Methode und den IS, so dass die Substanz ebenfalls ohne Berücksichtigung blieb. Durch diese Vorauswahl sind anschließend ausschließlich Substanzen untersucht worden, die die Präzision quantitativer MEKC-Bestimmungen signifikant verbessern. Dafür müssen die beschriebenen Substanzeigenschaften den Anforderungen aus Tabelle 10 entsprechen und die Methodenbeschreibungen Angaben zur Durchführung und erforderliche Validierungsdaten (Tabelle 8) enthalten.

Die 22 untersuchten Substanzen sind nach aufsteigendem Kapazitätsfaktor in Tabelle 13 gelistet.

4.5.3 Berechnung des Kapazitätsfaktors

Durch Angabe des Kapazitätsfaktors ist eine Anordnung der Substanzen in Migrationsreihenfolge möglich. Durch diese Information kann man entlang der Substanzliste gezielt nach dem Internen Standard suchen, der zur gewünschten Migrationszeit im Elektropherogramm erscheint.

Der Kapazitätsfaktors (k_s) wird nach S. Terabe als das Verhältnis der Stoffmenge des Analyten definiert, die von der Mizelle eingeschlossen ist und der Stoffmenge, die sich in der wässrigen Phase befindet [87] (vgl. Verteilungskoeffizient in 2.3).

$$k_s = \frac{n_{mc}}{n_{aq}} \quad \textbf{(Gleichung 14)}$$

k_s : Kapazitätsfaktor

n_{mc} : Stoffmenge, die sich in der mizellaren Phase befindet

n_{aq} : Stoffmenge, die sich in der wässrigen Phase befindet

Er ist identisch mit dem Quotienten aus der Aufenthaltsdauer in der stationären Phase und der mobilen Phase während einer chromatographischen Trennung.

Bei der Bestimmung des Kapazitätsfaktors in der MEKC muss berücksichtigt werden, dass die pseudostationäre Phase, die aus den Mizellen gebildet wird, nicht wie die stationäre Phase in der Chromatographie immobilisiert ist. Die Analyten werden auch mit der mizellaren Phase zum Detektor transportiert (Einfluss der Elektroosmose; 2.3). Deshalb findet die Geschwindigkeit der Mizellen Berücksichtigung in der Berechnung des Kapazitätsfaktors [88]:

$$k_s = \frac{t_R - t_0}{t_0 \cdot (1 - t_R / t_{mc})} \quad \text{(Gleichung 15)}$$

k_s : Kapazitätsfaktor

t_R : Migrationszeit

t_0 : Migrationszeit neutraler Teilchen; EOF-Marker

t_{mc} : Migrationszeit der Mizellen

Zur Berechnung des Kapazitätsfaktors müssen t_0 und t_{mc} bekannt sein. Es gibt jedoch keine idealen Marker für die MEKC. Der Marker des EOFs (t_0) muss elektrisch neutral sein und darf keine Wechselwirkungen mit den Mizellen eingehen. Das zum Puffer zugesetzte Methanol (Tabelle 11) ist sehr gut als EOF-Marker geeignet. Die Absorptionslöschung durch den Zusatz von 5,0 % MeOH ist eindeutig nachzuweisen (Abbildung 30). Schwieriger ist die Bestimmung der Wanderungsgeschwindigkeit der Mizellen. Stark lipophile Substanzen, wie z. B. Sudan III, von denen angenommen werden kann, dass sie sich lediglich innerhalb der Mizellen aufhalten, überladen in geringen Mengen, z. T. unter der Nachweißgrenze, die Mizellen. Die Bestimmungen sind nicht reproduzierbar und die Auflösung der anderen Peaks verschlechtert sich deutlich. Die Elektropherogramme sind für die Bestimmung des k_s -Wertes nicht auszuwerten.

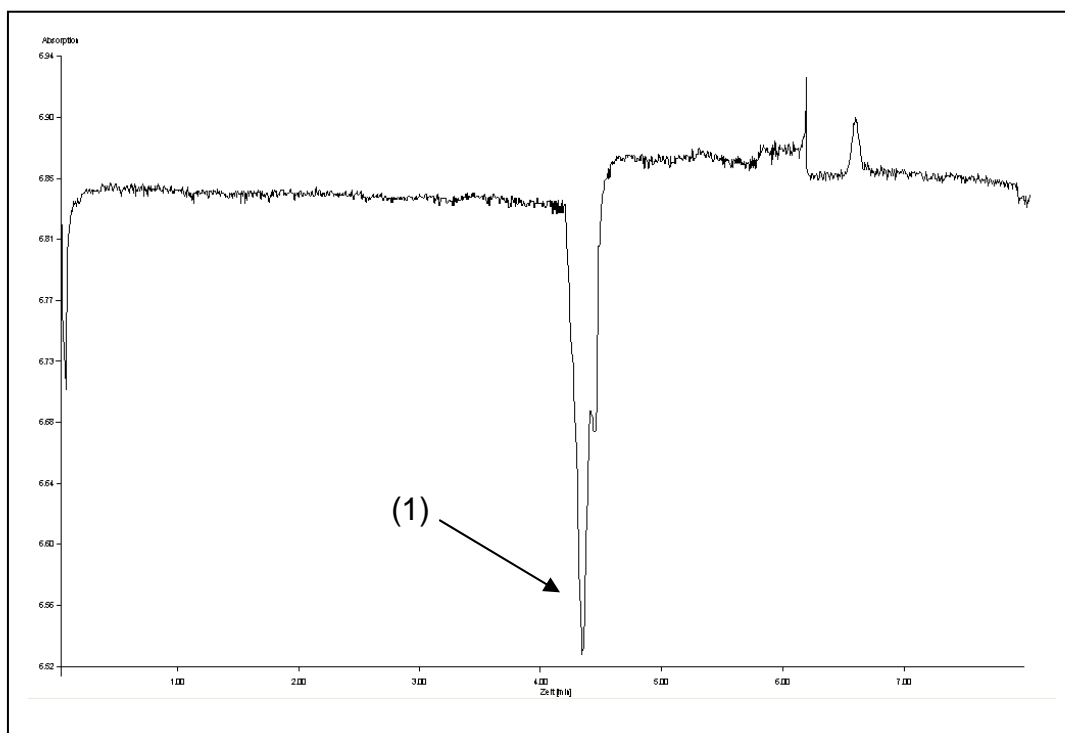


Abbildung 30: Bestimmung des EOFs (t_0); IS-Standardmethode;
(1) Methanol 5 %

Neben Sudan III ist im Rahmen dieser Arbeit auch n-Decanophenon als Mizellmarker getestet worden. Die Ergebnisse waren ebenfalls nicht reproduzierbar und für die Bestimmung des Kapazitätsfaktors nicht auszuwerten.

Die Darstellung des Migrationsfensters in der MEKC (Abbildung 31) erfolgt in der Literatur häufig nur schematisch, wie z. B. bei S. Terabe [89].

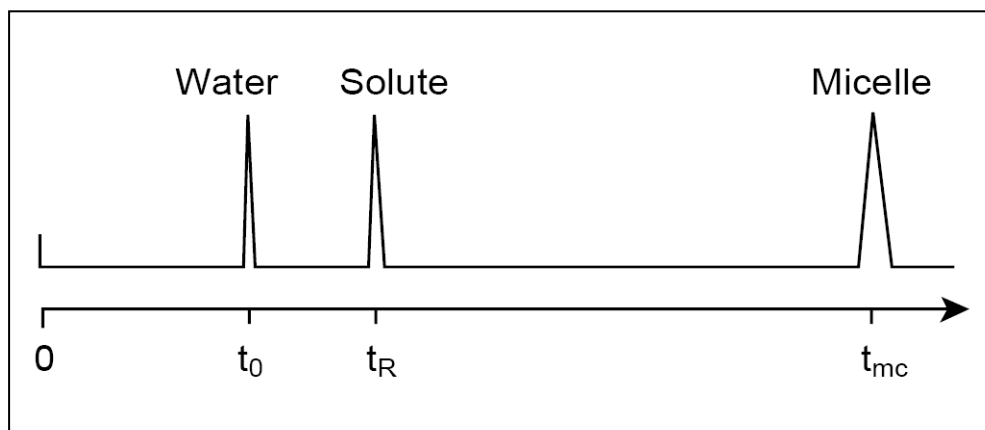


Abbildung 31: Schematische Darstellung des Migrationsfensters
in der MEKC aus [89]

Die Berechnung des k_s -Wertes für die IS-Substanzen ist in dieser Arbeit abweichend von Gleichung 15 durchgeführt worden. Der k_s -Wert ist ausschließlich auf die Migrationszeit des Elektroosmotischen Flusses (t_0) bezogen worden. Das entspricht der Berechnung des Kapazitätsfaktors, wie sie für chromatographische Methoden üblich ist (Gleichung 16):

$$k_s = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad \text{(Gleichung 16)}$$

k_s : Kapazitätsfaktor

t_R : Migrationszeit

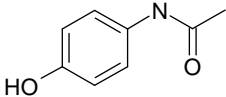
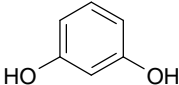
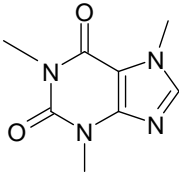
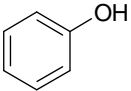
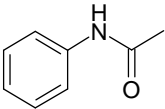
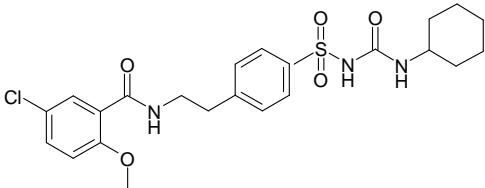
t_0 : Migrationszeit neutraler Teilchen; EOF-Marker

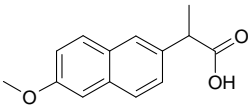
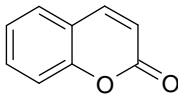
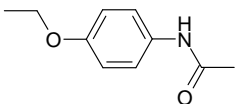
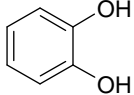
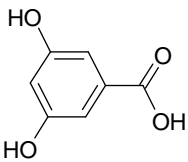
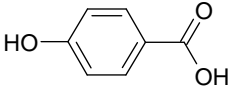
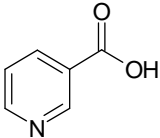
Die Untersuchungen haben gezeigt (4.6.1), dass der Einfluss der Methodenparameter, wie z. B. pH-Wert, angelegte Spannung oder die Länge der Kapillaren, sowohl die Migrationszeit des EOFs als auch die Migrationszeit der jeweiligen IS-Substanz in gleicher Weise beeinflussen. Die aufwendige Bestimmung der Migrationszeit der Mizellen und die Berücksichtigung bei der Berechnung des Kapazitätsfaktors war für unsere Zielsetzung nicht erforderlich. Deshalb bekam die direkte Berechnung des Kapazitätsfaktors (Gleichung 16) den Vorzug.

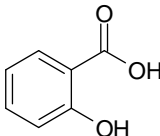
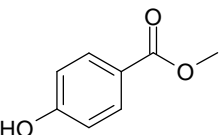
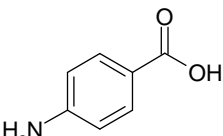
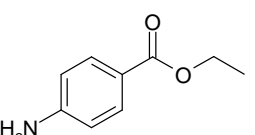
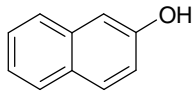
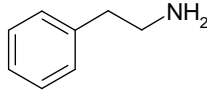
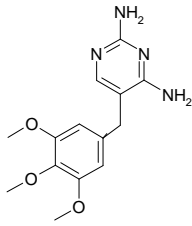
4.6 Ergebnisse und Zusammenfassung

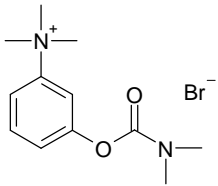
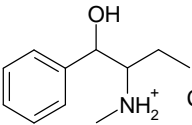
In Tabelle 13 sind die Ergebnisse der Substanzuntersuchungen zusammengestellt. Die Angabe des Kapazitätsfaktors (k_s -Wert; Gleichung 16), der Migrationszeit (t_R) und der relativen Migrationszeit ($t_R - t_0$) basierten auf je drei Messungen pro Substanz ($n=3$). Zusammen mit der Strukturformel und den Absorptionsmaxima (UV-Spektren: Anhang 3) stellt die Tabelle ein Arbeitsmittel für die schnelle Auswahl eines geeigneten Internen Standards in der Entwicklung quantitativer MEKC – Bestimmungen dar.

Tabelle 13 Charakterisierung der Internen Standardsubstanzen;
Methodenparameter gemäß IS-Standardmethode (Tabelle 11)

Interner Standard	Strukturformel	Migrationszeit (min) [t _R]	Relative Migrationszeit (min) [t _R -t ₀]	k _S	Konz. (mg/ml)	Abs. Max. (nm)
Paracetamol [5] **		4,81	0,69	0,16	2,0	243
Resorcin [90]		4,85	0,73	0,17	2,3	276
Coffein [91]		5,17	1,05	0,25	2,8	273
Phenol [92] **		5,20	1,07	0,26	3,9	273
Acetanilid [93]		5,81	1,67	0,40	2,7	241
Glibenclamid [94]		7,02	2,76	0,65	3,2	300 274

Interner Standard	Strukturformel	Migrationszeit (min) [t _R]	Relative Migrationszeit (min) [t _R -t ₀]	k _S	Konz. (mg/ml)	Abs. Max. (nm)*
Naproxen [95]		7,40	2,93	0,66	2,4	331 316 271 262
Cumarin [96] ***		7,43	3,31	0,80	2,1	277
Phenacetin [91]		7,73	3,45	0,81	2,8	249
Brenzkatechin [97] ***		7,78	3,50	0,82	2,1	282
3,5-Dihydroxybenzoesäure [72] ***		8,10	3,67	0,83	2,9	297
4-Hydroxybenzoesäure [96]		7,69	3,56	0,87	3,4	252
Nicotinsäure [5] **		7,95	3,84	0,93	1,8	263

Interner Standard	Strukturformel	Migrationszeit (min) [t _R]	Relative Migrationszeit (min) [t _R -t ₀]	k _s	Konz. (mg/ml)	Abs. Max. (nm)*
Salicylsäure [98]		7,97	3,85	0,93	1,9	302 234
p-Hydroxybenzoesäuremethylester ***		8,88	4,44	1,00	3,0	296
Aminobenzoesäure [99] **		8,33	4,21	1,02	2,2	288
Benzocain [100] **		9,10	4,65	1,05	2,3	292 220
2-Naphthol [92] **, ***		10,71	6,27	1,41	2,6	264 273 284
Phenylethylamin [101] ***		11,19	6,94	1,63	3,5	257
Trimethoprim [102] **		11,38	7,15	1,70	2,5	288

Interner Standard	Strukturformel	Migrationszeit (min) [t _R]	Relative Migrationszeit (min) [t _R -t ₀]	k _S	Konz. (mg/ml)	Abs. Max. (nm)*
Neostigminbromid [5]		12,43	7,95	1,77	2,8	267 261
Ephedrinhydrochlorid [103] **		12,15	7,86	1,83	2,8	262 256 250

* UV-Daten aus [104]

** IS-Substanz Bestandteil der IS8-Mischung (Tabelle 14)

*** Maxima übernommen aus den eigenen UV-Messungen (Anhang 3)

Anhand der Strukturformel können mögliche Interaktionen zwischen der Internen Standardsubstanz und Probenbestandteilen abgeschätzt werden. Unter Berücksichtigung der Methodenparameter kann zudem die Ladung und Löslichkeit des Moleküls erfasst werden. Beide sind für die Verteilung zwischen der wässrigen Phase und der mizellaren Phase äußerst wichtige Parameter in der MEKC.

Die k_s -Werte und die Migrationszeiten über einen Bereich von $t_m = 4$ bis $t_m > 12$ min ermöglichen die selektive Auswahl einer Substanz, die basisliniengetrennt zu jedem Probenbestandteil migriert. Abhängig vom Trennproblem muss die Konzentration der gewählten Substanz und ausgewählte Methodenparameter optimiert werden. Zu hohe Konzentrationen von Internem Standard und Analyten können zur Überladung der Mizellen führen. Darunter leidet die Reproduzierbarkeit der Migrationszeiten und infolge einer nicht idealen Peakform die Auflösung und die Trennleistung der Bestimmung.

Die Messungen unter Standardbedingungen nach S. Terabe ermöglichen einen erfolgreichen Transfer auf weitere MEKC-Methoden. Wenn nach einer Methode gearbeitet wird, die sich von diesen Bedingungen unterscheidet, kann wie folgt vorgegangen werden. Migriert die ausgewählte Interne Standardsubstanz früher als erforderlich, kann aus der Liste eine Substanz mit höherem k_s -Wert eingesetzt werden (tiefere Position in Tabelle 13 als die zuvor gewählte Substanz). Migriert die Substanz zu spät, kann eine Substanz mit kleinerem k_s -Wert ausgewählt werden (höhere Position in Tabelle 13 als die zuvor gewählte Substanz).

Abbildung 32 zeigt die Trennung einer Mischprobe aus 8 Internen Standardsubstanzen (IS8). Die Probe ist so aus der Auswahl der untersuchten Substanzen zusammengestellt worden, dass die ganze Breite des Migrationsfensters der IS-Liste abgedeckt wird. Durch die Bestimmung von IS8 konnte die Reproduzierbarkeit und die zu erwartende Präzision bei Verwendung dieser Substanzen ermittelt werden. Trotz der Bedingungen der IS-Standardmethode sind die Migrationszeiten der einzelnen Substanzen kürzer als sie in Tabelle 13 aufgeführt sind. Die höhere Anzahl an Analyten in der Probe reduziert die Wechselwirkungen der Einzelbestandteile mit den Mizellen. Die Konkurrenz und die Wechselwirkungen untereinander verkürzen die Migrationszeit der Analyten. Die Reihenfolge bleibt aber unverändert.

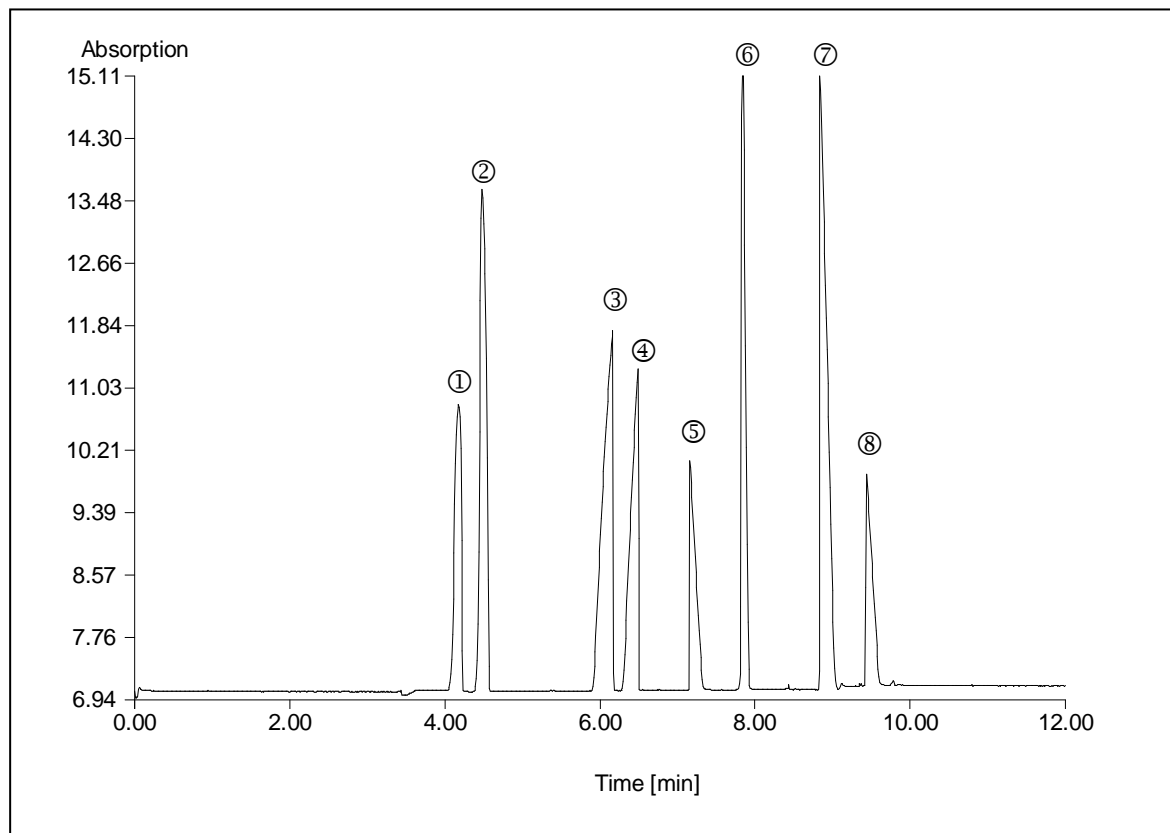


Abbildung 32: Trennung der IS8-Mischung (IS-Standardmethode, Tabelle 11)

MEKC-Bedingungen: 50 mM Boratpuffer pH 8,5, 50 mM SDS und 5 ml MeOH-Zusatz (3.95 mg / 100 ml), Spannung: + 20 kV, Injektion: 50 mbar, 18 sec, Detektion bei 210 nm; MeOH (EOF; $t_0 = 3,29$ min), Crystal CE System

- | | |
|-------------------------------------|--|
| ①: Paracetamol ($t_R = 4,05$ min) | ②: Phenol ($t_R = 4,35$ min) |
| ③: Nicotinsäure ($t_R = 6,02$ min) | ④: Aminobenzoesäure ($t_R = 6,23$ min) |
| ⑤: Benzocain ($t_R = 7,13$ min) | ⑥: 2-Naphthol ($t_R = 7,53$ min) |
| ⑦: Trimethoprim ($t_R = 9,09$ min) | ⑧: Ephedrinhydrochlorid ($t_R = 9,41$ min). |

In Tabelle 14 sind die Präzisionsdaten der IS8-Bestimmung angegeben. Es wurden über zwei Tage je 60 Messungen (jeweils 10 Bestimmungen aus drei Probenvials pro Tag) mit dem Crystal CE System durchgeführt (n = 60).

Tabelle 14 Präzisionsdaten der IS8-Bestimmung (RSD%); Methodenparameter gemäß IS-Standardmethode (Tabelle 11)				
Interne Standards	Konz. (mg/ml)	Wiederholpräzision		Intermediate Precision (Laborpräzision)
		(n = 30; Tag 1)	(n = 30; Tag 2)	
Paracetamol	2,0	1,0	1,0	1,1
Phenol	3,9	1,0	0,9	1,0
Nicotinsäure	1,8	0,9	1,1	1,1
Aminobenzoessäure	2,2	0,7	0,6	0,8
Benzocain	2,3	0,6	0,8	0,9
2-Naphthol	2,6	1,1	1,2	1,2
Trimethoprim	2,5	0,9	0,7	1,0
Ephedrin	2,8	1,2	1,0	1,2

4.6.1 Anwendungsbeispiele

Die Vorteile für zukünftige Methodenentwicklungen durch die Verwendung von Internen Standardsubstanzen [72, 76] konnte in verschiedenen Anwendungsbeispielen für die untersuchte Substanzauswahl bewiesen werden. In den folgenden Abschnitten sind Auszüge aus verschiedenen Anwendungen im Rahmen dieser Arbeit dargestellt, die den Einsatz von Internen Standards und die Leistungsverbesserung von Methodenparametern beschreiben.

4.6.1.1 Geräte- und Performance-Test

Die Basis für die Durchführung von validierten CE-Bestimmungen ist ein funktionstüchtiges und qualifiziertes CE-Instrument (Kapitel 3). Mit dem von Wätzig und Kunkel [72] beschriebenen Gerätetest können die verschiedenen Leistungsparameter untersucht werden und anhand der Ergebnisse verschiedene CE-Geräte miteinander verglichen werden. Die Durchführung dieses Performancetests empfiehlt sich nicht nur nach der Installation eines neuen Gerätes, sondern auch nach einem Transport, einer Reparatur oder Wartung und nach langen Betriebspausen. Dieser Test ist auch im Rahmen dieser Arbeit regelmäßig angewendet worden, um Gerätefehler bei Performanceverlust zu identifizieren. Dabei stand vor allem die Injektionsgenauigkeit im Vordergrund. Ebenso ist bei der Inbetriebnahme des PrinCE 550 Systems die Funktionsfähigkeit und Gerätequalifizierung anhand der 1997 veröffentlichten Methode durchgeführt worden.

Abbildung 33 zeigt die Auftrennung der Testsubstanzen gemäß der Methodenbeschreibung in [72]. Alle drei Substanzen - Paracetamol (33.1), Nicotinsäure (33.2) und 3,5-Dihydroxybenzoesäure (33.3) - sind Substanzen der IS-Auswahl. Abhängig von der Injektionsgenauigkeit des getesteten Gerätes wurden in über 30 durchgeführten Tests relative Standardabweichungen [RSD%] von 0,8 (Prince 550 zur Wiederinbetriebnahme nach Wartung) bis über 5,0 (UniCam Crystal CE 310 System mit beschädigtem Drucksystem) erhalten. Tabelle 15 A zeigt die Ergebnisse des Gerätetests nach Reparatur des Drucksystems und Wartung des Crystal CE 310 Systems. Für die weitere Auswertung ist jeweils eine Substanz als Interner Standard definiert worden. Die absoluten Peakflächen der beiden anderen Substanzen wurden auf die absolute Peakfläche des Internen Standards bezogen. Die Ergebnisse in Tabelle 15 B bis D weisen eine deutliche Erhöhung der Präzision auf.

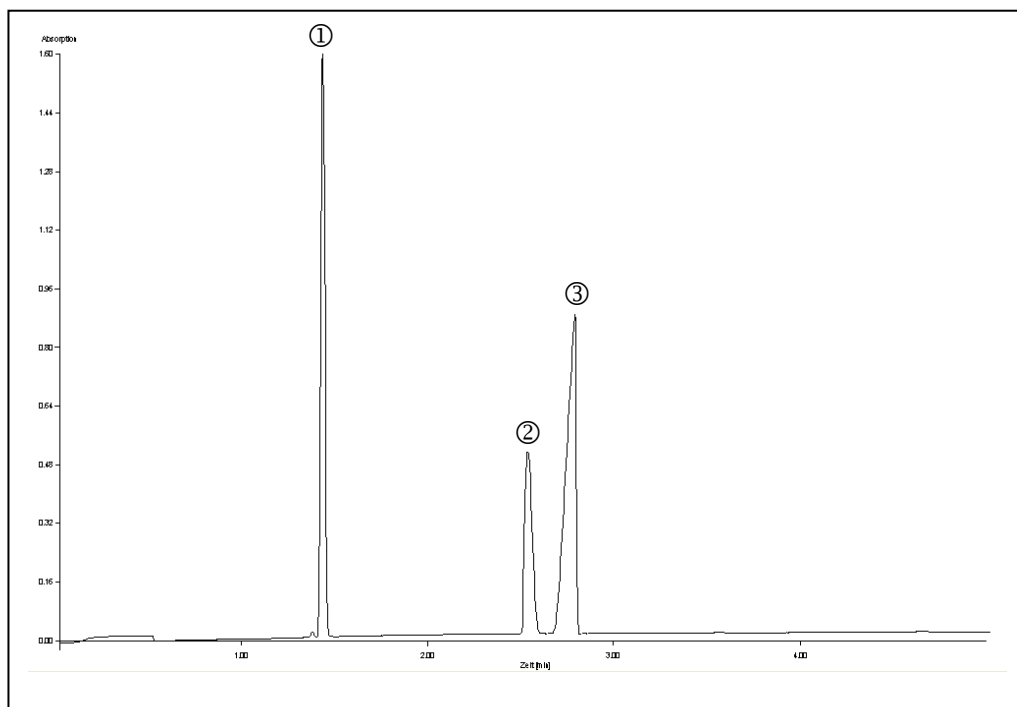


Abbildung 33: Performancetest: Crystal CE System [72]

①: Paracetamol

②: Nicotinsäure

③: 3,5-Dihydroxybenzoesäure

Die Erhöhung der Peakflächenpräzision durch den Bezug der absoluten Peakflächen auf einen Internen Standard ist in allen durchgeführten Performancetests zu erkennen. Ausnahmen bilden die Testdurchführungen, die infolge eines Leistungsabfalls notwendig geworden waren, der auf Detektionsfehlern beruht. Bei schwacher Lampenleistung und hohem Rauschen des Detektorsignals ist der Einsatz Interner Standards ohne positiven Einfluss auf die Präzision.

Wenn die Ursache des Leistungsabfalls auf Integrationsfehlern beruht, kann der Einsatz von Internen Standards den Gesamtfehler signifikant erhöhen und zu einer Verschlechterung der Präzision führen. Denn durch jeden weiteren Einzelwert, der fehlerbehaftet ist, wird beim Übertragen in die Berechnung der Betrag des Gesamtfehlers größer. Diese Fehlerfortpflanzung kann durch die Verwendung von IS nicht verringert werden. Die manuelle Nachbearbeitung mit Hilfe von Standardintegrationssoftware führt zu nicht nachvollziehbaren Manipulationen des Analysenergebnisses. Die Wiederholung der Auswertung mit spezieller

Integrationssoftware, die mit leistungsstärkeren Integrationsalgorithmen arbeitet (KISS;[105]) gewährleistet valide Ergebnisse.

Tabelle 15 Präzisionsdaten des Gerätetests (RSD%); Methodenparameter gemäß [72]						
A: Ohne Internen Standard						
	Peakfläche			Präzision (RSD%; n = 60)		
	AU _{abs}	AU _{korrr}	AU _{rel}	AU _{abs}	AU _{korrr}	AU _{rel}
Paracetamol	501,8	15122	--	1,75	1,63	--
Nicotinsäure	227,3	38,8	--	2,90	1,97	--
3,5-Dihydroxybenzoesäure	484,5	75,4	--	2,69	1,56	--
B: Interner Standard: Paracetamol						
	Peakfläche			Präzision (n = 60)		
	AU _{abs}	AU _{korrr}	AU _{rel}	AU _{abs}	AU _{korrr}	AU _{rel}
Paracetamol	501,8	151,2	1	1,75	1,63	--
Nicotinsäure	227,3	38,8	0,45	2,90	1,97	1,30
3,5-Dihydroxybenzoesäure	484,5	75,4	0,97	2,69	1,56	1,15
C: Interner Standard: Nicotinsäure						
	Peakfläche			Präzision (n = 60)		
	AU _{abs}	AU _{korrr}	AU _{rel}	AU _{abs}	AU _{korrr}	AU _{rel}
Paracetamol	501,8	151,2	2,21	1,75	1,63	1,28
Nicotinsäure	227,3	38,8	1	2,90	1,97	--
3,5-Dihydroxybenzoesäure	484,5	75,4	2,13	2,69	1,56	0,48
D: Interner Standard: 3,5-Dihydroxybenzoesäure						
	Peakfläche			Präzision (n = 60)		
	AU _{abs}	AU _{korrr}	AU _{rel}	AU _{abs}	AU _{korrr}	AU _{rel}
Paracetamol	501,8	151,2	1,04	1,75	1,63	1,13
Nicotinsäure	227,3	38,8	0,47	2,90	1,97	0,48
3,5-Dihydroxybenzoesäure	484,5	75,4	1	2,69	1,56	--

4.6.1.2 Trennung der Inhaltsstoffe des Erkältungsstoffes Wick MediNait™

Im folgenden Kapitel ist die Auftrennung und quantitative Bestimmung der Inhaltsstoffe von Wick MediNait™ beschrieben. Im Rahmen der Methodenentwicklung konnte die Präzision der Peakflächen durch den Einsatz einer Internen Standardsubstanz verbessert werden. Die Auswahl des Internen Standards erfolgte ohne zeitaufwendige Vorversuche aus der IS-Liste wie in Abschnitt 4.6 beschrieben. Nach Aminobenzoessäure, das mit Probenbestandteilen zeitgleich migrierte, konnte Benzocain als Interner Standard mit Erfolg verwendet werden (5.5.2). Die Änderung der Migrationszeiten gegenüber den Angaben in Tabelle 13 resultieren aus den abweichenden Methodenbedingungen der WICK-Methode (5.4) und spiegelt sich auch in der Bestimmung von IS8 unter diesen Bedingungen wieder.

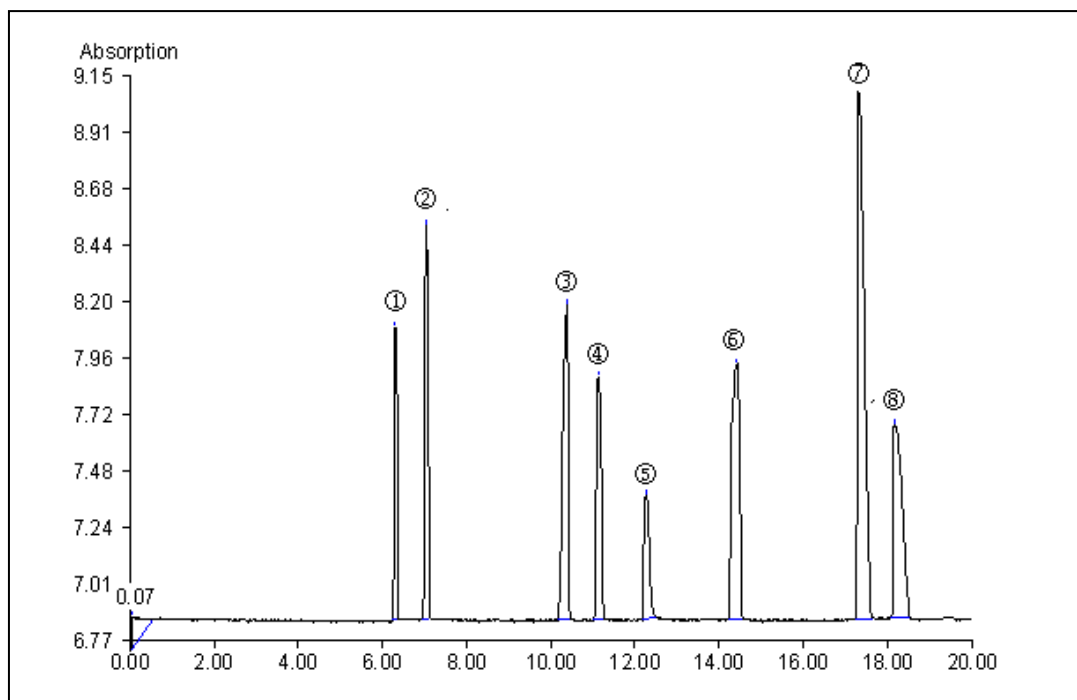


Abbildung 34: Trennung der IS8-Mischung; WICK-Methode (5.4)

- | | |
|--------------------------------------|--|
| ①: Paracetamol ($t_R = 6,19$ min) | ②: Phenol ($t_R = 7,02$ min) |
| ③: Nicotinsäure ($t_R = 10,23$ min) | ④: Aminobenzoessäure ($t_R = 11,08$ min) |
| ⑤: Benzocain ($t_R = 12,13$ min) | ⑥: 2-Naphthol ($t_R = 14,26$ min) |
| ⑦: Trimethoprim ($t_R = 17,19$ min) | ⑧: Ephedrinhydrochlorid ($t_R = 18,11$ min) |

5 Trennung der Inhaltsstoffe des Erkältungssaftes Wick MediNait™

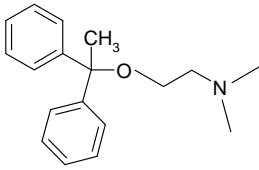
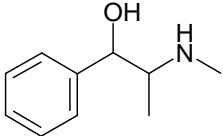
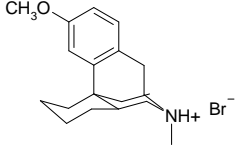
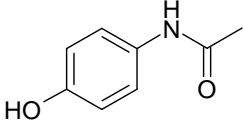
5.1 Einleitung

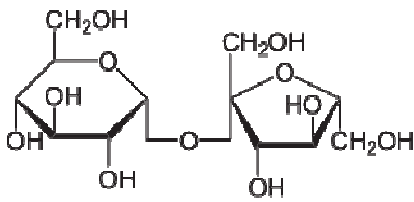
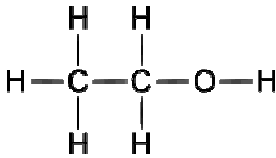
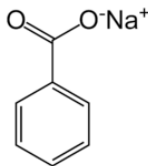
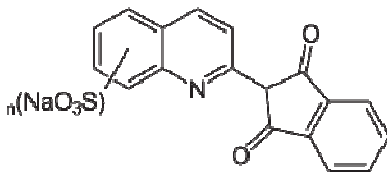
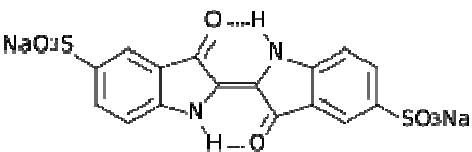
Die selektive Bestimmung von Inhaltsstoffen in einer Formulierung, in der weitere Substanzen (Hilfsstoffmatrix) enthalten sind, stellt in der Analytik eine besondere Herausforderung dar. Die Bestandteile müssen voneinander getrennt werden, um reproduzierbar quantifiziert werden zu können. Dabei müssen in der Routineanalytik der Aufwand in der Probenvorbereitung und die Analysenzeit möglichst gering gehalten werden, um einen standardisierten Ablauf mit hohem Probendurchsatz zu gewährleisten.

Bestehende analytische Methoden zur Bestimmung der Wirkstoffe (APIs) der Erkältungssaftformulierung Wick MediNait™ (WICK Pharma, Schwalbach) setzten sich aus mehreren HPLC-Bestimmungen zusammen. Die Komponenten werden unter verschiedenen Methodenbedingungen einzeln voneinander bestimmt. Vier separate Gehaltsbestimmungen für Doxylamin, Ephedrin, Dextromethorphan und Paracetamol sind gemessen an modernen Analysenmethoden zu zeitaufwendig und zu vorbereitungsintensiv [106]. Die außerordentlich hohen Konzentrationsunterschiede zwischen den einzelnen Wirkstoffen (Tabelle 16) erschweren eine zeitgleiche präzise Quantifizierung. Für die Bestimmung mittels HPLC werden die Wirkstoffe aus der Formulierung extrahiert und von den weiteren Komponenten abgetrennt. So werden störende Einflüsse der Hilfsstoffe, wie Ethanol und Saccharose, ausgeschlossen. Zusammen mit weiteren Zusatzstoffen, wie Farbstoffen und Konservierungsmitteln, führen diese bei der Bestimmung zu Störungen, so dass eine selektive Quantifizierung nicht möglich ist.

Das Ziel der Methodenentwicklung war es zunächst, alle Komponenten innerhalb eines Analysenlaufs voneinander zu trennen, um dann jeden Bestandteil selektiv zu bestimmen. Ausgangspunkt ist die von L. Suntornsuk beschriebene MEKC-Methode (Tabelle 17) zur Trennung der Inhaltsstoffe von Erkältungssaft [106]. Die MEKC besitzt durch ihr Zusammenspiel aus elektrophoretischen und chromatographischen Mechanismen (2.3) eine hohe Trennleistung [8, 107], die den angewendeten HPLC-Methoden überlegen ist. Eine ausreichende Präzision und Reproduzierbarkeit konnte aber in der veröffentlichten Arbeit von L. Suntornsuk nicht nachgewiesen werden.

5.2 Zusammensetzung des Erkältungssaftes Wick MediNait™

Tabelle 16	Wirkstoffe und Hilfsstoffe in Wick MediNait™
Wirkstoffe	
Doxylamin (Gruppe der Ethanolamine)	
<p>pK_s = 9,3</p> <p>XlogP : 2,509</p> <p>Konz.: 0,025 g / 100 ml</p>	
H1-Rezeptor-Antagonist, Muskarin-Rezeptor-Antagonist Kurzzeitschlafmittel zur Milderung von Erkältungs- & Allergiesymptomen	
Ephedrin (Gruppe der Phenylalkylamine; Alkaloid)	
<p>pK_s = 9,6</p> <p>XlogP : 1,507</p> <p>Konz.: 0,0267 g / 100 ml</p>	
Sympathomimetikum (Freisetzung von Noradrenalin und Adrenalin) Arzneistoff gegen Symptome asthmatischer Anfälle und Schnupfen	
Dextromethorphan (synthetisches Opiod)	
<p>pK_s = 9,2</p> <p>XlogP : 4,323</p> <p>Konz.: 0,05 g / 100 ml</p>	
Sigma-Rezeptor-Agonist, NMDA-Rezeptor-Antagonist (nicht kompetitiv) Antitussivum	
Paracetamol (Gruppe der Nichtopioid-Analgetika)	
<p>pK_s = 9,5</p> <p>XlogP : 0,917</p> <p>Konz.: 2,0 g / 100 ml</p>	
Analgetikum, Antiinflammatorika	

Hilfsstoffe (Auswahl)	
Saccharose (Disaccharid)	
27,5 % (w/v) Dimer Glucose und Fructose reduzierender Zucker	
Haushalts- oder Kristallzucker	
Ethanol	
18,0 % (v/v) leicht entzündlich hygroscopisch	
Organisches Lösemittel (einwertiger Alkohol)	
Natriumbezoat (Konservierungsmittel)	
E 211 hygroscopisch Natriumsalz	
Bakteriostatischer und fungistatischer Lebensmittelzusatzstoff	
Chinolin Gelb (Farbstoff)	
E 104 Abs.Max.: 412 nm & 289 nm Dinatriumsalz	
Wasserlösliche Lebensmittelfarbe	
Indigokarmin (Farbstoff)	
E 132 Abs.Max.: 608 bis 612 nm Dinatriumsalz	
Blaue Lebensmittelfarbe	

5.3 Matrix – Kapillarwandinteraktionen

Die Rezeptur der Erkältungssaftformulierung gab Grund zu der Annahme, dass Bestandteile der Matrix nach nur wenigen Analysenläufen die Kapillare blockieren würden. Vortests auf Glasplatten bestätigten, dass sich bei nicht ausreichender Reinigung Reste der Formulierung auf der Oberfläche ablagerten. In zahlreichen praktischen und theoretischen Arbeiten ist der Einfluss von Veränderungen der Kapillaroberfläche, z. B. durch die Adsorption von Analyten, auf das ξ -(Zeta-) Potenzial untersucht worden [2]. Um über längere Analysenserien reproduzierbare Methodenbedingungen zu erhalten, war vor allem die Stabilisierung der potenzialbestimmenden Prozesse an der Grenzfläche entscheidend, um eine Streuung der Messwerte zu verhindern. Deshalb stand die Eignungsprüfung diverser Spülprozeduren am Beginn der Entwicklung im Vordergrund. Dabei wurden die Zusammensetzung und Kombination der Spülreagenzien, die Zeitdauer, die Spülrichtung (Wischeffekt) und die Temperatur während der Spülprozedur variiert. Letztendlich zeigte sich deutlich, dass allein die Zusammensetzung des Trennpuffers das Auftreten der Wandadsorption von Matrixbestandteilen verhindern konnte. Die Entwicklung einer differenzierten Spülprozedur trat nach der Pufferrezepturfindung in den Hintergrund der Methodenentwicklung.

5.4 Methodenentwicklung

Ausgangspunkt der Entwicklung war die von L. Suntornsuk [106] veröffentlichte Methode (Tabelle 17). Die Proben, die von L. Suntornsuk untersucht wurden, waren allerdings in Wasser gelöste Standards von Wirkstoffen, die in Erkältungssäften verwendet werden. Zusätze, wie in einer Arzneiform, wurden bei den Messungen nicht berücksichtigt. Zusätzliche Bestandteile (Matrix) in der Wick®-Formulierung erfordern einen höheren Entwicklungsaufwand, um eine Basislinientrennung aller enthaltenen Probenbestandteile zu erreichen und die selektive Bestimmung durchführen zu können. Auch die Stabilität des Systems über längere Serien wird dadurch beeinträchtigt (5.3). Aus diesem Grund gestaltete sich die Entwicklung einer robusten Bestimmungsmethode charakterisiert durch reproduzierbare Migrationszeiten, Peakformen und -flächen wesentlich umfangreicher, als ohne störende Begleitstoffe.

Tabelle 17		Methodenbedingungen
	Startmethode [106]	Nach der Methodenentwicklung
Trennpuffer (5.4.1)	Dihydrogenphosphat- / Boratpuffer (10 mM)	Boratpuffer (10 mM)
	pH 9.0	pH 10.0 (5.4.1.2)
	50 mM SDS	150 mM SDS (5.4.1.3)
	5.0 % Methanol	7.5 % Methanol (5.4.1.4)
	-	Kein Cyclodextrinzusatz (5.4.1.4)
Spülprozedur (Aktivierung)	-	NaOH-Lsg. / Wasser / Puffer (je 30 min bei 1500 mbar) Boratpuffer (60 min, 30 kV)
(Vor jeder Injektion)	-	NaOH-Lsg. / Puffer (je 2 min bei 1500 mbar) Boratpuffer: (1 min, 30 kV)
Running sequence	- (n = 5)	5 x 4 Injektionen (n = 20)
Puffervialgröße	-	4.0 ml
Vialverschluss	-	Verschluss mit Parafilm „M“
Spannung	25 kV	30 kV
Detektion	UV (214 nm)	UV (214 nm)
Kapillare	75 µm i.d. x 60 cm (l _{det} : 52 cm)	50 µm i.d. x 85 cm (l _{det} : 31 cm)
Injektion	Hydrostatisch 10 cm, 10 sec	Hydrodynamisch 50 mbar, 18 sec
Interner Standard	-	Benzocain

5.4.1 Puffer

5.4.1.1 Puffertyp und Einfluss der Puffermolarität

Wie oben diskutiert, konnten die Inhaltsstoffe in wässrigen Lösungen mit dem von L. Suntornsuk (Tabelle 17) verwendeten Puffer getrennt werden. Aufgrund der Einarbeitung in die Matrix der Arzneiformulierung war die Weiterentwicklung zu einer selektiveren Methode nötig. In Abbildung 35 ist zu erkennen, dass mit dem Phosphat-Boratpuffer (Startmethode; Tabelle 17) eine Bestimmung der Inhaltsstoffe direkt aus der verdünnten Probe nicht möglich war.

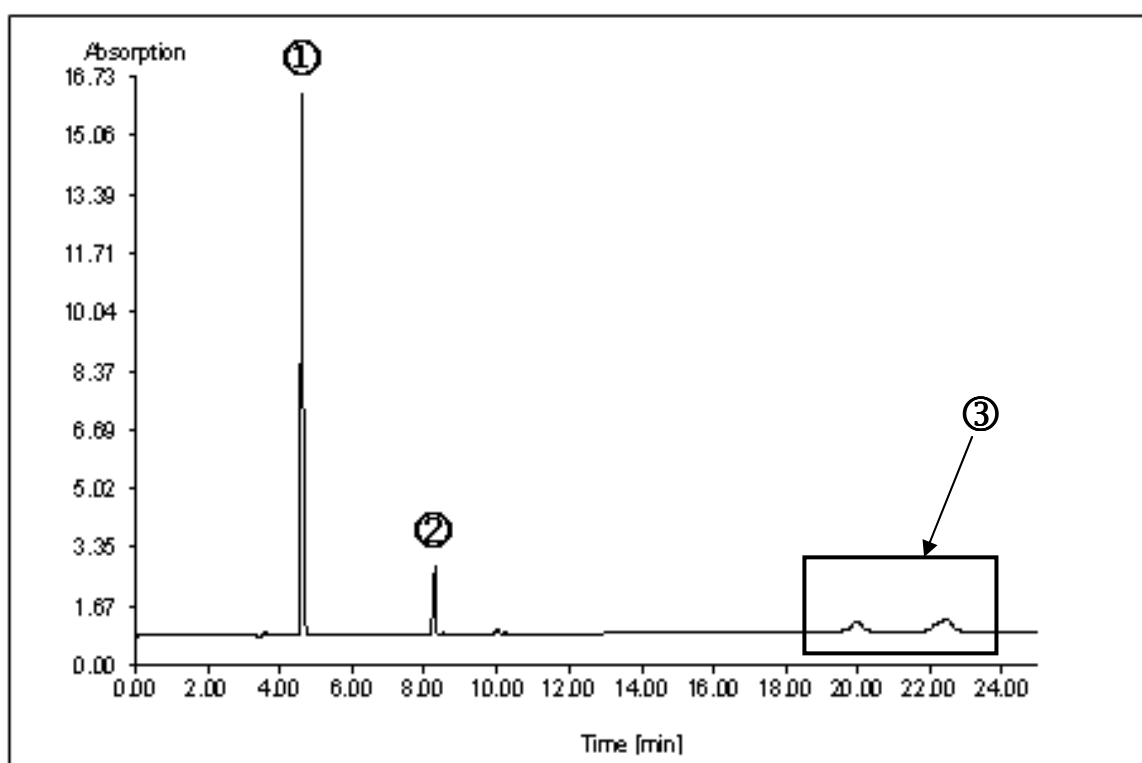


Abbildung 35: Trennung der Inhaltsstoffe des Erkältungssafts

Trennpuffer: Phosphat-Boratpuffer (10 mM, pH 9); alle Methodenparameter entsprechen den Angaben in Tabelle 17 (Startmethode, [106]), UniCAM Crystal 310 CE System (8.1.1).

① : Paracetamol ② : Natriumbenzoat ③ : weitere Inhaltsstoffe

Schrittweise wurde die Molarität des Puffers bis zu 60 mM erhöht. Beginnend mit der in Abbildung 35 dargestellten Trennung mit 10 mM Puffer wurde die Konzentration jeweils um 10 mM erhöht und bei jedem Konzentrationsschritt (10; 20; 30, 40; 50 und 60 mM) fünf Analysenläufe durchgeführt. Die Erhöhung der Pufferkonzentration verursachte einen sprunghaften Anstieg der Wärmeentwicklung innerhalb der Kapillaren. Deshalb verschlechterten sich die Ergebnisse mit jedem zusätzlichen Konzentrationsschritt. Bei 60 mM sind die Läufe ohne Ergebnis abgebrochen worden, da durch den hohen Widerstand innerhalb des Stromfeldes, verursacht durch die Wärmeentwicklung, der Grenzwert der Stromstärke (150 μ A) erreicht worden ist. Ohne Wechsel des Puffertyps konnte eine selektive Trennung ohne weitere Probenvorbereitung nicht erreicht werden. Der erste Schlüsselparameter in der Methodenentwicklung war der Wechsel von Phosphat-Boratpuffer zu einem Boratpuffer (10mM). Abbildung 36 verdeutlicht die verbesserte Trennung durch Einsatz des Boratpuffers.

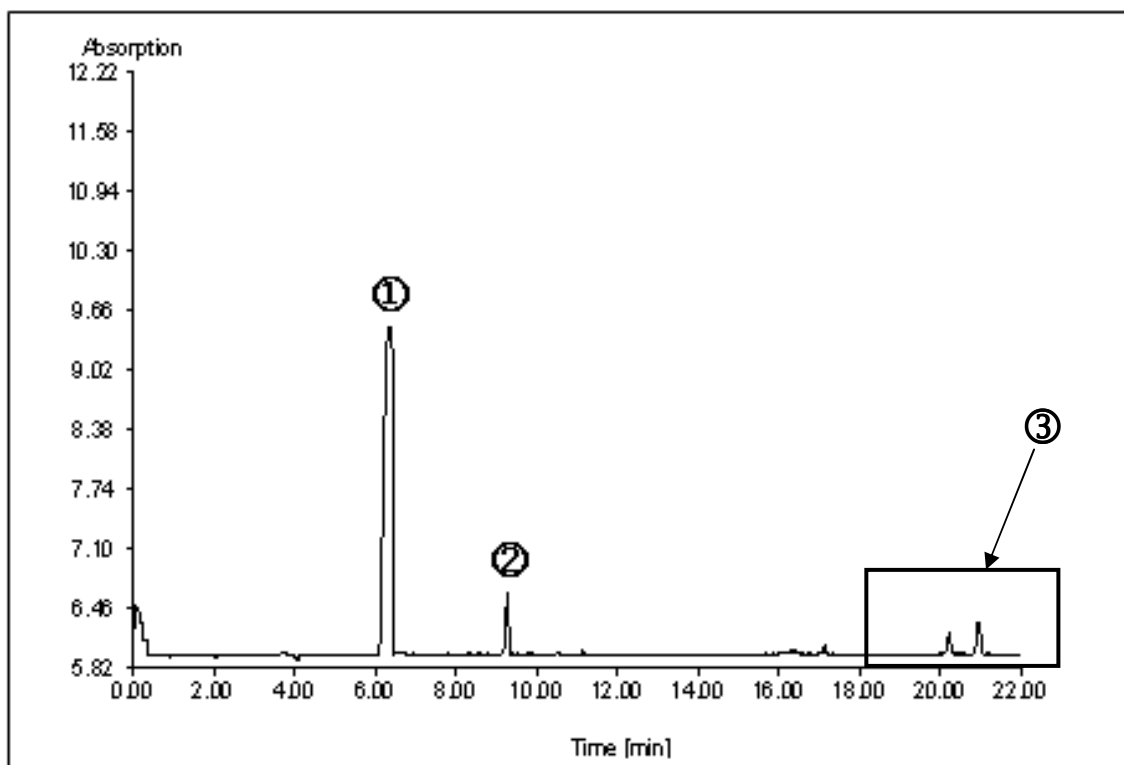


Abbildung 36: Trennung der Inhaltsstoffe des Erkältungsstoffes;

Trennpuffer: Boratpuffer (10 mM, pH 9); alle Methodenparameter entsprechen den Angaben in Tabelle 17 (Startmethode, [106]), UniCAM Crystal 310 CE System (8.1.1).

① : Paracetamol ② : Natriumbenzoat ③ : weitere Inhaltsstoffe

Paracetamol und Natriumbenzoat konnten durch Zuspiken der Standardsubstanzen den ersten beiden Peaks zugeordnet werden. Auch die mit ③ gekennzeichneten Peaks konnten im Laufe der Methodenentwicklung eindeutig zugeordnet und als Doxylamin, Ephedrin und Dextrometorphan identifiziert werden. Entscheidend in diesem Schritt war, dass sich die Peakform und Trennung der spät migrierenden Substanzen nach dem Puffertypwechsel signifikant verbessert hatten. Die folgende Methodenentwicklung fokussierte sich auf den Boratpuffer. Dabei konzentrierten sich die Optimierungsschritte auf den pH-Wert des Puffers, die Konzentration des SDS-Zusatzes und weiterer Pufferzusätze wie z. B. MeOH oder Cyclodextrine.

5.4.1.2 Einfluss des Puffer pH-Wertes

Wie in der CZE ist der pH-Wert der Pufferlösung ein wichtiger Faktor bei der Optimierung von MEKC-Methoden. Zum einen hat der pH-Wert direkte Auswirkung auf die Stärke des elektroosmotischen Flusses (2.2.2). Bei einem pH-Wert von 5 oder niedriger wandern die negativ geladenen Mizellen schneller als der EOF [108] (Abbildung 16). Dagegen resultiert aus Werten über 5 ein stabiler, starker elektroosmotischer Fluss, der die Wanderung der Mizellen überlagert. Dadurch wird sichergestellt, dass alle Probenbestandteile am Detektorfenster vorbei in die gleiche Richtung wandern [109]. Zum anderen wird die elektrophoretische Mobilität der Analytmoleküle durch eine Änderung des pH-Wertes beeinflusst. Das gilt vor allem bei der Bestimmung von sauren oder basischen Substanzen, die pH-Wert abhängig ihre Ladung ändern. Saure Substanzen sind bei einem hohen pH-Wert ionisiert und besitzen eine niedrigere elektrische Mobilität als die SDS-Mizellen. Neutrale Moleküle werden durch den pH-Wert nicht signifikant in ihrer elektrophoretischen Mobilität beeinflusst. Nicht nur der EOF und die elektrophoretische Mobilität der einzelnen Moleküle sind vom pH-Wert abhängig. Auch die Wechselwirkungen

zwischen den Analyten und den Mizellen bilden sich je nach pH -Wert unterschiedlich intensiv aus. Wie stark ausgeprägt der Einfluss der Mizellen auf die Wanderungsgeschwindigkeit der Analytmoleküle ist, lässt sich dabei nur schwer voraussagen.

Um alle Probenbestandteile zu erfassen, erschien es zunächst sinnvoll, mit dem beschriebenen pH -Wert der Methode von Suntornsuk [106] zu starten. Unter Verwendung des Boratpuffers (10 mM; 50 mM SDS, 5 % MeOH) wurde die in Abbildung 37 A gezeigte Trennung des Erkältungsstoffes erhalten.

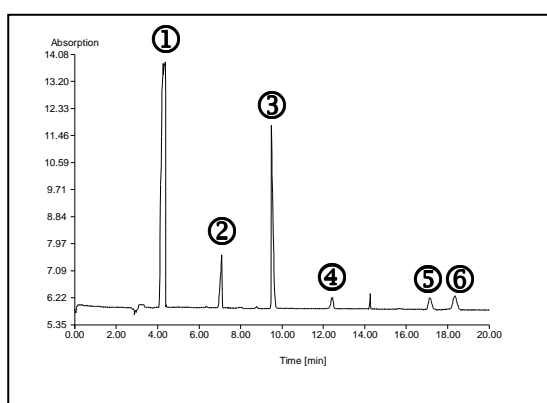


Abbildung 37 A: Lauf 1

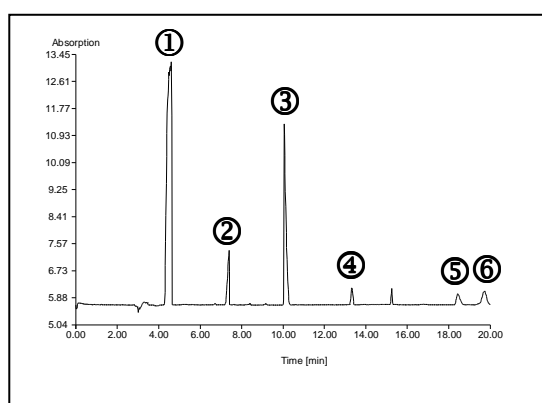


Abbildung 37 B: Lauf 3

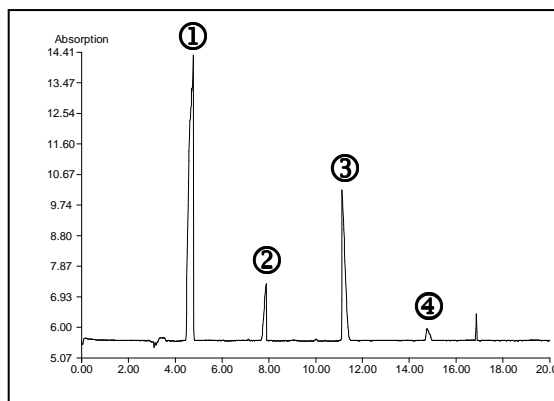


Abbildung 37 C: Lauf 6

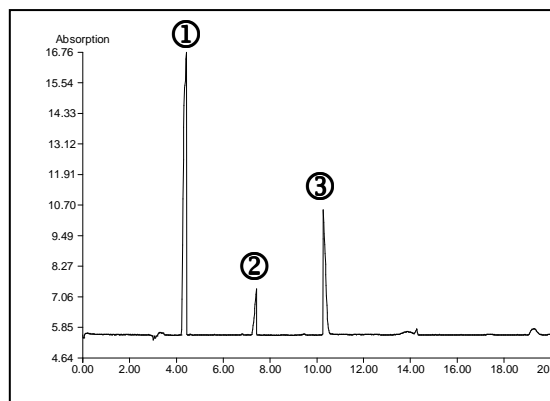


Abbildung 37 D: Lauf 9

Abbildung 37 A bis D: Trennung der Inhaltsstoffe des Erkältungsstoffes mit Phosphatpuffer pH 9,0; alle weiteren Methodenparameter entsprechen den Angaben in Tabelle 17 (Startmethode, [106]), UniCAM Crystal 310 CE System (8.1.1).

- | | | |
|-----------------|--------------------|----------------------|
| ① : Paracetamol | ② : Natriumbenzoat | ③ : Benzocain (IS) |
| ④ : Ephedrin | ⑤ : Doxylamin | ⑥ : Dextromethorphan |

Die Abbildung 37 A bis D aus einer Analysenserie, verdeutlicht, dass mit zunehmender Laufanzahl (1 → 3 → 6 → 9) die Migrationszeiten der spät migrierenden Substanzen (④, ⑤ & ⑥) immer größer werden, und die Wanderungsgeschwindigkeiten der Analyten nicht reproduzierbar sind. Vermutlich war die Ursache für dieses Phänomen die Adsorption von Matrixbestandteilen an der Kapillarwand. Die Zunahme der Migrationszeiten mit jedem Lauf und die signifikante Verschlechterung der Trennung markiert den zunehmenden Aufbau an der Kapillarwand. Nach dem dritten Lauf sind Doxylamin und Dextromethorphan nicht mehr zu detektieren. Um die Kapillarwand zu regenerieren, ist die Spülprozedur zwischen den einzelnen Läufen intensiviert worden. Die einzelnen Spülschritte sind bis zu 15 min verlängert worden, dabei ist auch die Spülrichtung gewechselt worden (Vakuum auf der Injektionsseite der Kapillare), um die Kapillarwand zu reinigen. Reproduzierbare Analysebedingungen konnten aber selbst durch diese drastischen Maßnahmen nicht erreicht werden. Zudem sind ausgiebige und zeitintensive Spülprozeduren nach jedem Lauf für Anwendungen in der Routineanalytik zu aufwendig und wenig praxisorientiert.

Die Optimierung der Methodenparameter während der Trennung stand deshalb im Fokus der weiteren Entwicklungsschritte. Auf Glasscheiben wurde die Adsorption der Probenbestandteile an der Kapillarwand simuliert. In Vortests wurde untersucht, welche Faktoren das Verkleben der Glasfläche verhindern. Durch darauf folgende Analysenläufe wurden die Ergebnisse bestätigt: Der pH-Wert des Trennpuffers und die Konzentration des SDS-Zusatzes (5.4.1.3) zeigten sich als die zwei signifikanten Einflussgrößen. Eine hohe SDS Konzentration und die Einstellung des pH-Wertes auf 10 führten zur selektiven und reproduzierbaren Trennungen der Probenbestandteile.

Der Einfluss des pH-Wertes wurde über den Bereich von 8,5 bis 11,5 untersucht. Abbildung 38 fasst die Ergebnisse der Analysenläufe bei unterschiedlichen pH-Werten zusammen. Die höchste Auflösung bei symmetrischen Peakformen konnte bei einem pH-Wert von 10,0 erreicht werden. Bei geringeren Werten wurde ein deutlicher Verlust der Trennleistung registriert. Bestimmungen bei höheren pH-Werten (>10,2) waren für die Gesamtdauer eines Analysenlaufes nicht ausreichend robust und stabil.

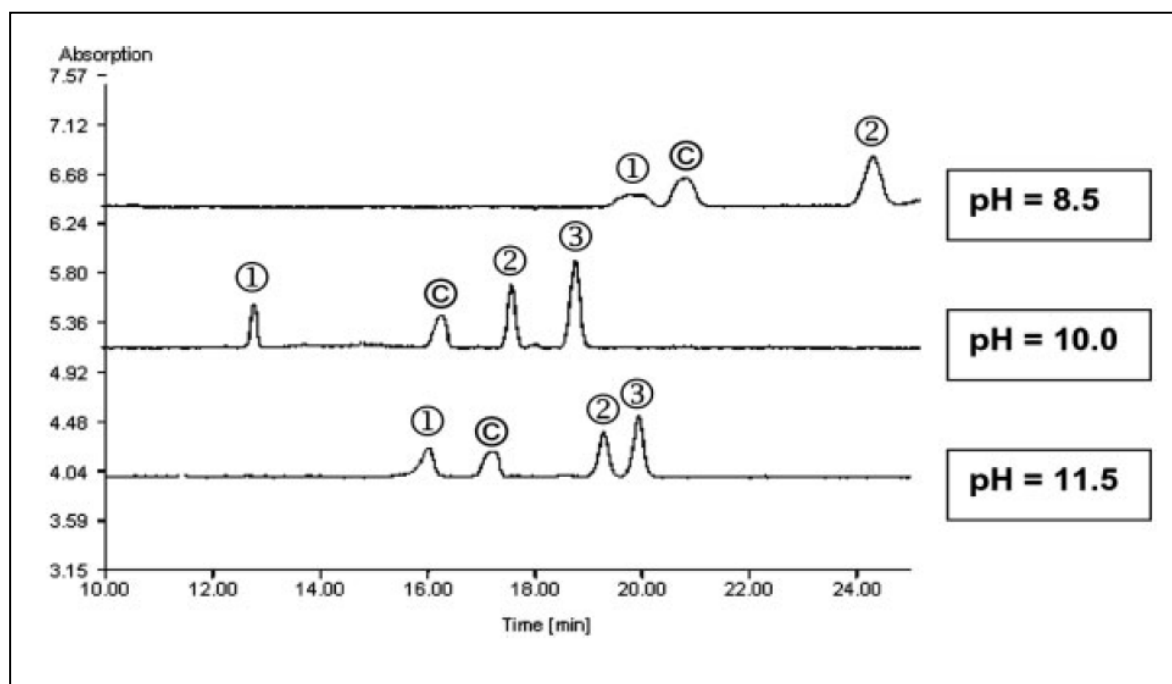


Abbildung 38: Untersuchung des Erkältungsstoffes bei unterschiedlichen pH -Werten; Boratpuffer (10 mM), alle weiteren Methodenparameter entsprechen den Angaben in Tabelle 17 (Startmethode, [106]), UniCAM Crystal 310 CE System (8.1.1).

① : Ephedrin ② : Doxylamin ③ : Dextromethorphan

© : Farbstoff

Tabelle 18 zeigt die Veränderung des pH -Wertes im Inlet- und Outlet-Vial, wenn die Puffervials nicht luftdicht verschlossen werden.

Tabelle 18 pH -Wert-Veränderung über eine Laufserie (n = 10) – ohne Cover										
Vial	pH -Werte									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Inlet	10.05	9.96	9.89	9.86	9.78	9.68	9.59	9.50	9.43	9.27
Outlet	10.10	10.08	10.03	10.06	10.01	9.96	10.01	9.93	9.93	9.83

Während einer Messserie über 10 Läufe wurde nach jedem Lauf der pH-Wert in den Vials bestimmt und ein deutlicher Abfall vor allem im Inlet-Vial erhalten. Dieser Effekt kann durch die Aufnahme von CO₂ aus der Luft in die Pufferlösung erklärt werden und wird durch den elektrophoretischen Prozess verstärkt. Durch den Abfall des pH-Werts werden der EOF und die Ladungsverhältnisse der ionisierbaren Analyten beeinflusst. Dadurch verschlechtert sich die Auflösung der Trennung und die Präzision von Peakflächen und Migrationszeit leiden darunter. Deshalb ist es erforderlich, die Pufferlösung für jede Bestimmungsserie frisch herzustellen und die in Vials abgefüllte Lösung luftdicht zu verschließen (Abbildung 39).

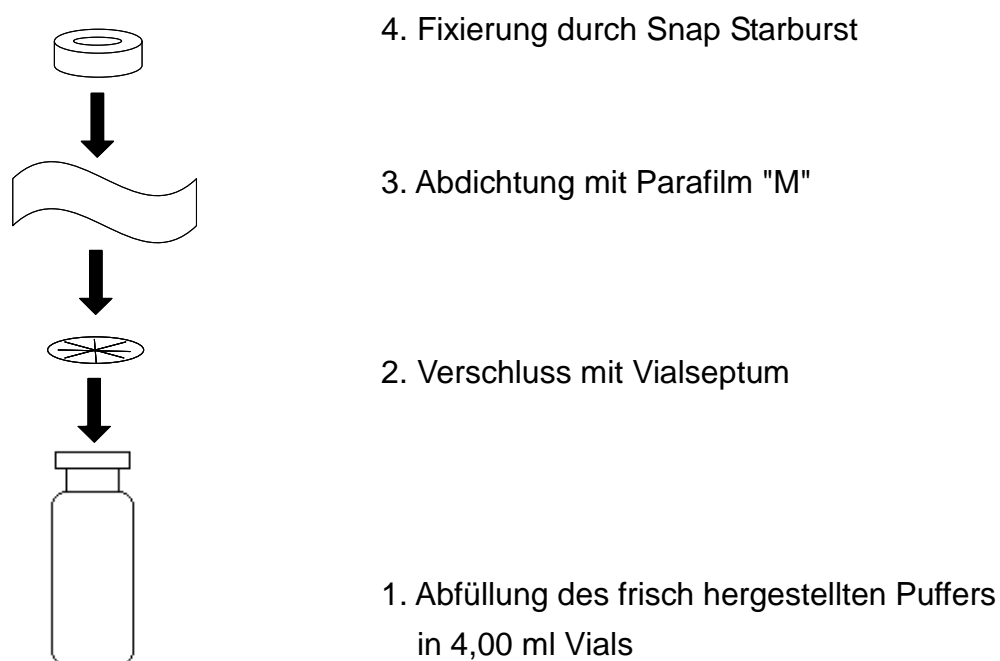


Abbildung 39: Luftdichter Abschluss der Probenvials

Dieses Verfahren erwies sich als schnellste und sichere Methode, die Pufferlösungen über die Zeit einer Messserie (n = 20) zu schützen. Voraussetzung war dabei, dass die Abdeckung der Vials mit Parafilm keine Gerätestörung während des Eintauchens der Kapillare und der Elektrode in die verschlossenen Vials verursachte. Nur bei einer fehlerfreien, robusten Durchführung der Messserien, wurden reproduzierbare Analysenergebnisse erhalten.

Die Übersichtungung der Pufferlösung mit Mineralöl blieb ohne Erfolg. Die hohe Konzentration des oberflächenaktiven Natriumdodecylsulfats (5.4.1.3) führte dazu, dass sich keine Phasengrenze zwischen Pufferlösung und Öl ausbildete, sondern sich beide Phasen vermischten. Durch die Vermischung konnte der Puffer nicht ausreichend geschützt werden, außerdem beeinflusste die Untermischung des Öls im Puffer die Qualität der Trennung.

5.4.1.3 Einfluss der SDS-Konzentration

Zusätzlich zum pH-Wert war die SDS-Konzentration ein entscheidender Parameter für die Qualität der Trennung. Experimente mit verschiedenen SDS-Konzentrationen zeigten, dass ein Anstieg der Tensid-Konzentration zu einer höheren Auflösung führte. Das Optimum lag bei einer SDS-Konzentration von 150 mM (Abbildung 40).

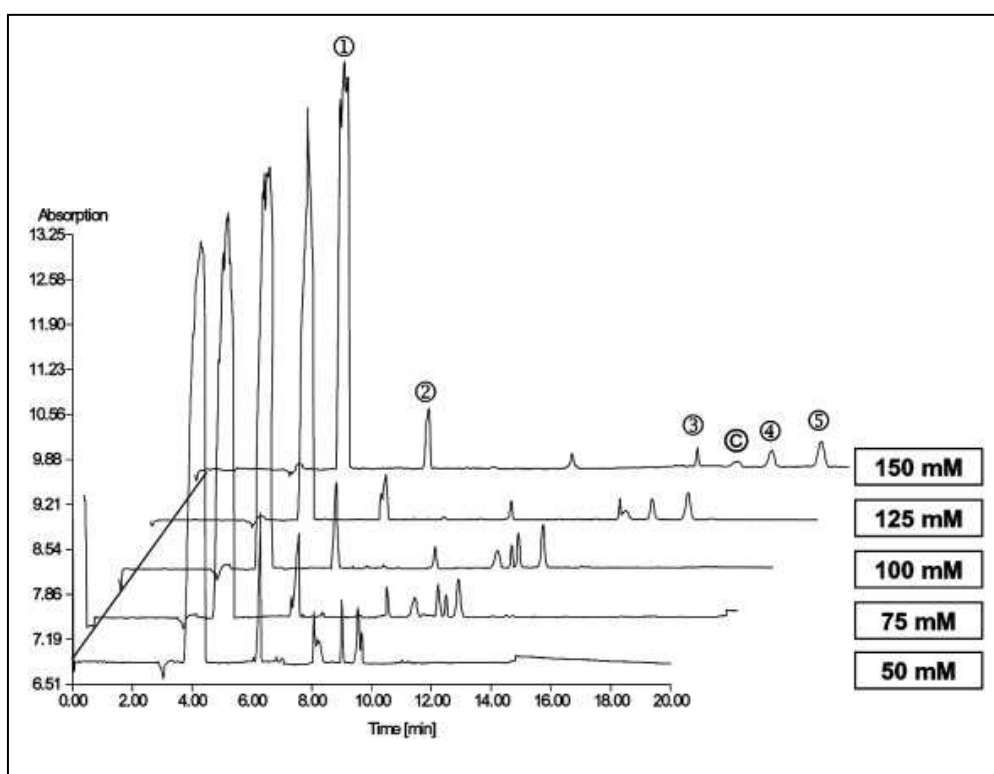


Abbildung 40: Untersuchung bei verschiedenen SDS-Konzentrationen (50 mM bis 150 mM);

Boratpuffer (10 mM), alle weiteren Methodenparameter entsprechen den Angaben in Tabelle 17 (Startmethode, [106]), UniCAM Crystal 310 CE System (8.1.1).

① : Paracetamol

② : Natriumbenzoat

③ : Ephedrin

④ : Doxylamin

⑤ : Dextromethorphan

© : Farbstoffzusatz

Der Anstieg der SDS-Konzentration hatte eine Abnahme des EOFs und eine erhöhte Viskosität der Lösung zur Folge. Beide Effekte führten zu längeren Analysenzeiten und zu einem Verlust der Trennleistung oberhalb des Tensid-Konzentrations-optimums. Zusätzlich konnte bei SDS-Konzentrationen oberhalb von 200 mM die Temperatur innerhalb der Kapillaren nicht mehr konstant gehalten werden, welches zu Folge hatte, dass es kurze Zeit nach Anlegen des elektrischen Feldes zu einer Bandenverbreiterung infolge der Jouleschen Wärme kam, und dementsprechend die Analysen abgebrochen werden mussten.

Die gewählte SDS-Konzentration von 150 mM hatte keinen Einfluss auf die Detektionsgrenze. Die UV-Spektren (Anhang 5) selbst höherer Tensid-Konzentrationen (bis zu 250 mM) im Puffer blieben im Vergleich zu den Spektren reiner Pufferlösungen unverändert.

5.4.1.4 Einfluss der Methanol-Konzentration

In der MEKC besteht eine Beziehung zwischen der Geschwindigkeit des EOFs und der Konzentration von organischen Zusätzen (Lösungsmittel), verursacht durch Abhängigkeit des EOFs von der Viskosität, die durch den Zusatz von organischen Lösungsmitteln beeinflusst wird [110]. Außerdem ist es möglich, das Verteilungs-Gleichgewicht zwischen der wässrigen und pseudostationären Phase zu beeinflussen, indem organische Lösungsmittel zugegeben werden. Dieser Zusatz zum Trennpuffer vergrößert das Migrationsfenster und erhöht die Auflösung spät migrierender Komponenten. Nach Suntornsuk [106] verbessert die Zugabe von 5 % Methanol zum Laufpuffer die Trennung der Inhaltsstoffe des Erkältungssaftes. Weitere Untersuchungen zeigten, dass in Gegenwart der Matrixbestandteile eine höhere Methanol-Konzentration die Trennung verbessert hat. Die Experimente wurden mit einer Borat-Pufferlösung durchgeführt (10 mM; pH 10; 150 mM SDS), die verschiedene Methanol-Konzentrationen zwischen 5 und 10 % enthielt. Wie

Abbildung 41 zeigt, wurde bei einer Methanol-Konzentration von 7,5 % eine bessere Auflösung der spät migrierenden Komponenten erzielt. Ein Anstieg der Methanol-Konzentration auf 10 % und höher führte zu einem Anstieg der gesamten Migrationszeit auf bis zu über 25 Minuten.

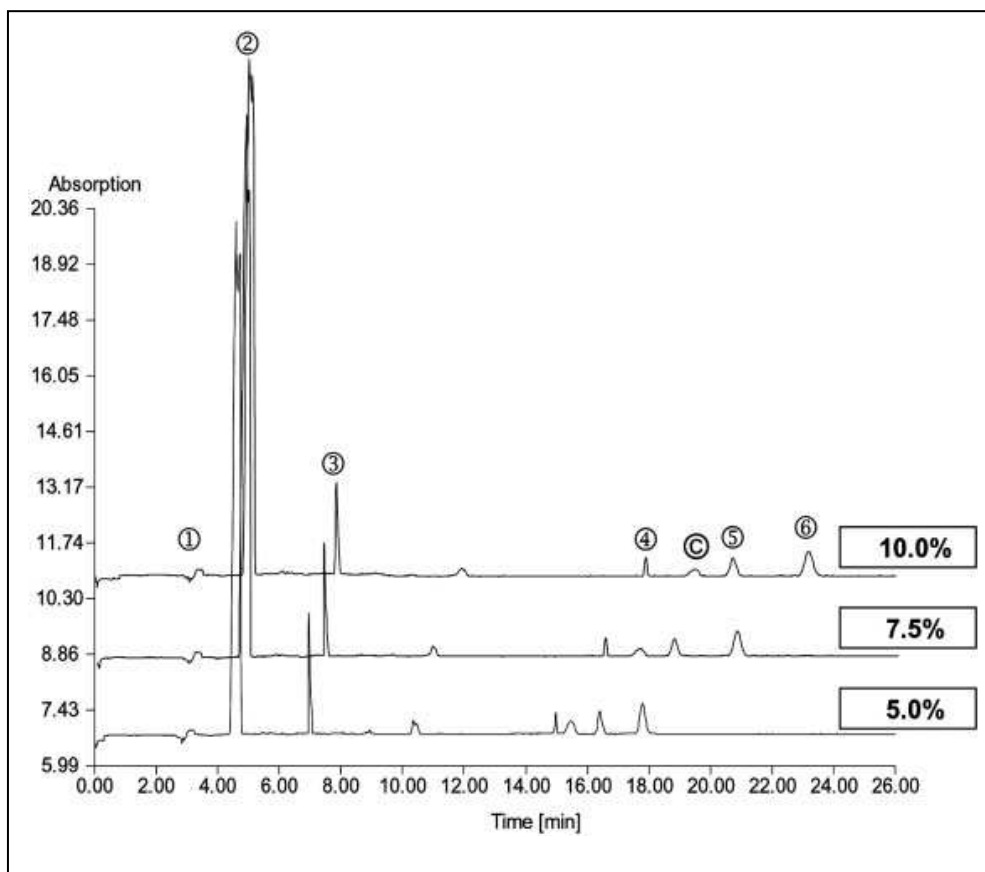


Abbildung 41: Untersuchung bei verschiedenen Methanol Konzentrationen
(5,0, 7,5 und 10,0 %);

Boratpuffer (10 mM), alle weiteren Methodenparameter entsprechen den Angaben in Tabelle 17 (Nach der Methodenentwicklung) UniCam Crystal 310 CE System (8.1.1).

① : EOF

② : Paracetamol

③ : Natriumbenzoat

④ : Ephedrin

⑤ : Doxylamin

⑥ : Dextromethorphan

© : Farbstoffzusatz

In der Phase der Methodenentwicklung wurden Cyclodextrine (natives α -, β -, und γ -CD) zu der Pufferlösung gegeben [87]. Allerdings wurde dadurch die Effizienz der Trennung nicht signifikant verbessert, so dass die Zugabe von Cyclodextrinen (als Pufferzugabe) wieder verworfen wurde.

5.4.2 Spülprozedur zwischen den Analysenläufen

Von Suntornsuk [106] ist keine definierte Spülprozedur beschrieben. Terabe [91] zeigte auf der Grundlage verschiedener Untersuchungen, dass für die MEKC eine Spülprozedur mit Natriumhydroxid (0,1 mol/L) erforderlich ist, um leistungsstarke Methoden mit hoher Präzision zu erhalten. Dieses ist besonders wichtig, wenn die Bestimmung der Analyten in Gegenwart einer komplexen Matrix von Hilfsstoffen durchgeführt wird. Die Untersuchungen wurden mit einer langen Zeit für die Spülprozedur (10 min.) begonnen. Die Experimente zeigten, dass die Zeit für das Spülen der Kapillare aufgrund des hohen pH-Wertes und der erhöhten SDS-Konzentration auf 5 Minuten reduziert werden konnte. Die neue Spülprozedur gewährleistete die Reinigung der Kapillaroberfläche von anhaftenden Matrixkomponenten, welche trotz der optimierten Parameter sonst in der Kapillare verblieben wären. Zusätzlich zu der Reinigung, garantierte die Spülprozedur außerdem einen stabilen EOF, die Basis für präzise Analysenergebnisse.

5.5 Methodvalidierung

5.5.1 Selektivität

Um die Identität der Analyten abzusichern, wurden die Substanzen einzeln zu Verdünnungen der Probe gespiket, so dass sie jeweils den gefundenen Peaks zugeordnet werden konnten. Zusätzlich zu den API-Peaks wurden im Elektropherogramm noch einige andere Peaks gefunden (Abbildung 40). Diese resultierten von in der Matrix enthaltenen Hilfsstoffen, dazu gehörten Farbstoffzusätze wie Chinolin-Gelb (E 104) und Indigokarmin (E 132) sowie der Konservierungsstoff Natriumbenzoat (E 211).

5.5.2 Präzision

Nachdem die Selektivität der Methode bewiesen werden konnte, war das Ziel der weiteren Methodenentwicklung eine schnelle, aber vor allem präzise Methode für die Routineanalytik zu beschreiben. Die Bestimmung in Anwesenheit der Matrixbestandteile und der Konzentrationsunterschied der einzelnen Wirkstoffe stellten dabei die größten Herausforderungen dar.

Die Peakform des Paracetamols zeigte einen deutlichen Überladungseffekt. Die Präzision der Peakfläche wurde durch diesen Effekt jedoch nicht verschlechtert. Das Überladen der Hauptkomponente war nicht zu vermeiden, da das Injektionsvolumen an die niedriger konzentrierten Komponenten, wie Ephedrin, Doxylamin und Dextromethorphan angepasst werden musste, um die gewünschten QLs zu erreichen.

Unabhängig von den untersuchten Parametern zeigte der Paracetamol-Peak während der Entwicklung der Methode eine Doppelspitze (Abbildung 42).

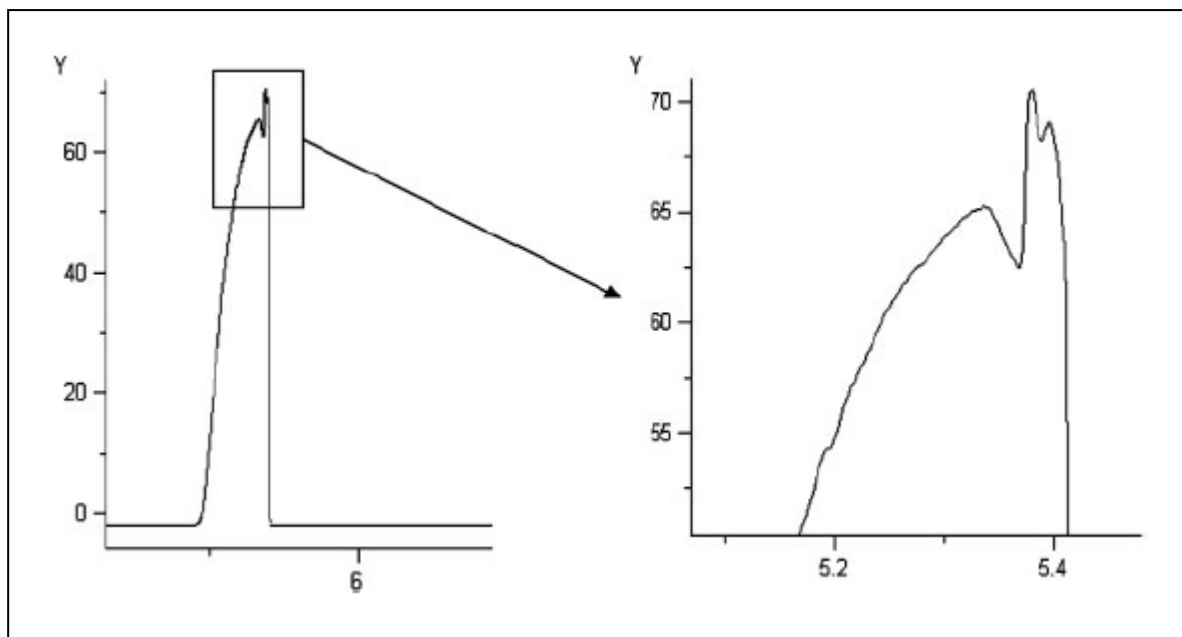


Abbildung 42: Aufspaltung des Paracetamol-Peaks

Alle Methodenparameter entsprechen den Angaben in Tabelle 17 (Nach der Methodenentwicklung), PrinCE 550 CE System (8.1.1).

Das Auftreten von Doppelspitzen in der MEKC wird hauptsächlich durch den differenzierenden Effekt organischer Lösungsmittel auf die Proben und durch die hydrophoben Eigenschaften der Analyten verursacht [111, 112].

Auch eine hohe SDS-Konzentration konnte nicht verhindern, dass der Paracetamol-Peak eine Doppelspitze aufwies. Dieser Effekt könnte auf den Einfluss der Matrix auf die pseudostationäre Phase zurückzuführen sein. Da die Präzision der Peakfläche von der Doppelspitze unbeeinflusst blieb, wurden keine weiteren Schritte unternommen, um diese Phänomen zu verhindern.

Die Wiederholpräzision der Peakflächen entsprach trotz stabiler Analysenserien lediglich einer RSD% von 2,6 % (Paracetamol) bis 5,8 % (Dextromethorphan). Im nächsten Schritt war es erforderlich, eine passende Interne Standardsubstanz zu finden.

Die Auswahl der Standardsubstanz erfolgte basierend auf den Ergebnissen, die durch die in Kapitel 4 beschriebenen Untersuchungen erhaltenen worden waren. Die in [113] veröffentlichten Daten geben einen Überblick über die Eignung verschiedener ISs für die entwickelte MEKC-Methode. Basierend auf diesen Daten wurde Benzocain als erfolgversprechender Interner Standard für die Quantifizierung der Komponenten des Erkältungssaftes identifiziert. Benzocain migriert innerhalb des Migrationsfensters der zu bestimmenden Inhaltsstoffe, aber nicht zusammen mit einer der zu bestimmenden Komponenten (Abbildung 43).

Im nächsten Entwicklungsschritt wurde eine passende IS-Konzentration ermittelt, um die Präzision der Peakfläche zu optimieren, ohne die Auflösung der Trennung zu beeinflussen. Die Verwendung hoher Konzentrationen führte zu einem guten Signal/Rausch-Verhältnis, wodurch eine hohe Präzision in der Bestimmung der Peakfläche möglich ist [1, 7]. Eine überhöhte Benzocain-Konzentration hatte allerdings eine verringerte Auflösung der Peaks von Ephedrin, Doxylamin und Dextromethorphan und somit einen Verlust der Trennleistung zur Folge. Möglicherweise ist dies auf eine Überladung der Mizellen zurückzuführen. Trotzdem konnten die Konzentration des Internen Standards wegen der hohen SDS-

Konzentration (150 mM) höher gewählt werden, als in vorhergehenden, allgemeinen Untersuchungen (Kapitel 4.6). Die Zugabe von 80,0 mg Benzocain auf 10,0 mL Erkältungssaft vor dem Verdünnungsschritt (1:4) erwies sich als optimal.

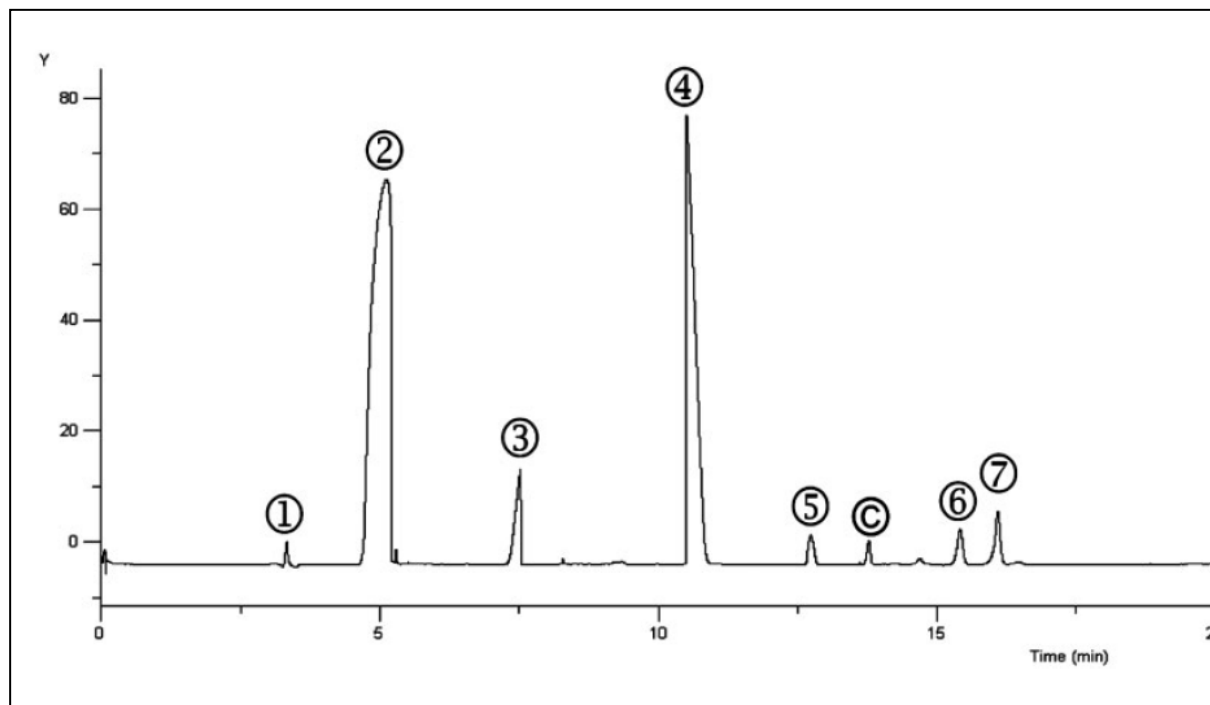


Abbildung 43: Trennung der Inhaltsstoffe des Erkältungssaftes mit zugesetztem Internen Standard;

Alle Methodenparameter entsprechen den Angaben in Tabelle 17 (Nach der Methodenentwicklung), PrinCE 550 CE System (8.1.1).

- | | | |
|----------------------|---------------------|--------------------|
| ① : EOF | ② : Paracetamol | ③ : Natriumbenzoat |
| ④ : Benzocain | ⑤ : Ephedrin | ⑥ : Doxylamin |
| ⑦ : Dextromethorphan | ③ : Farbstoffzusatz | |

Die Präzisionsdaten der Peakflächen sind in Tabelle 4 aufgeführt. Unter Verwendung des IS werden RSD%-Werte zwischen 1,0 und 2,0 % ($n = 20$) erreicht. Abweichungen in der Migrationszeit wurden am besten kompensiert, wenn der IS nahe der Analyten eluierten ($\text{RSD\%} \leq 1\%$ für die Peakfläche von Natriumbenzoat). Die Präzisionsdaten der spät migrierenden Komponenten waren umso besser je

näher sie an Benzocain migrierten (RSD%: 1,3; 1,7; 2,0 % für die Peakflächen von Ephedrin, Doxylamin und Dextromethorphan). Die Verbesserung der Präzision bei Verwendung von Benzocain als IS war für alle Analyten signifikant.

Die Präzision der Methode wurde aus 5 unterschiedlichen Probenansätzen bestimmt. Die Ansätze wurden jeweils innerhalb von 4 Läufen (Reproduzierbarkeit) analysiert, um die Wiederholpräzision einer Sequenz (n = 20; Intermediate Precision) zu berechnen (Tabelle 19).

Tabelle 19	Präzisionsdaten (n = 20)				
Inhaltsstoffe	Korrigierte Peak-Fläche		Normalisierte Peak-Fläche		Geringste Auflösung zum benachbarten Peak
	\bar{X}	RSD%	\bar{X}	RSD%	
Paracetamol	8,262	2,64	2,030	1,12	5,8
Natriumbenzoat	0,314	2,73	0,191	0,98	9,1
Ephedrin	0,075	2,67	0,048	1,30	5,4
Doxylamin	0,068	4,35	0,057	1,71	2,2
Dextromethorphan	0,151	5,85	0,136	2,02	3,4

Die korrigierte Peakfläche (AU_{kor}) entspricht dem Verhältnis zwischen der absoluten Peakfläche (AU_{abs}) der Analyten und der Migrationszeit (t_R). Die normalisierte Peakfläche (AU_{rel}) entspricht dem Verhältnis zwischen der absoluten Peakfläche (AU_{abs}) der Analyten und der absoluten Peakfläche (AU_{abs}) des Internen Standards.

Die Methodenparameter entsprechen den Angaben in Tabelle 17 (Nach der Methodenentwicklung), PrinCE 550 CE System (8.1.1).

5.5.3 Robustheit

Der hohe pH-Wert des Puffers erwies sich als sensibler Methoden-Parameter mit entscheidendem Einfluss auf die Präzision und Robustheit der Methode. Solange der pH-Wert konstant blieb, war die Bestimmung der Analyten von kleinen, beabsichtigten Abweichungen der Methoden-Parameter unbeeinflusst, wie Experimente während der Methodenentwicklung zeigten.

5.6 Zusammenfassung

Es wurde erfolgreich eine selektive und präzise MEKC-Methode für die Trennung von Inhaltsstoffen eines Erkältungssaftes in Gegenwart einer komplexen Matrix entwickelt ohne aufwendige Probenaufbereitung.

Die wichtigsten Parameter, die im Laufe der Entwicklungsphase optimiert werden mussten, waren der Puffertyp (Wechsel zu reinem Borat), der pH-Wert (Erhöhung von 9 auf 10), und die SDS-Konzentration (Erhöhung von 50 auf 150 mM). Die Optimierung der Pufferlösung (Kapitel 5.4.1) führte zu einer selektiven und präzisen Trennung. Die Einführung einer IS-Substanz verbesserte zusätzlich das Ergebnis im Hinblick auf die Präzision (Kapitel 5.5.2), so dass RSD%-Werte für die Peakflächen zwischen 1,0 % für die Hauptkomponente (Paracetamol) und 2,0 % für niedriger konzentrierte Analyten erreicht wurden.

6 Bestimmung der enantiomeren Verunreinigungen

6.1 Einleitung

Aufgrund der zunehmenden Zahl von Entwicklungen stereoselektiv reagierender, chiraler Wirkstoffe ist es erforderlich, neue Wege zu finden, um neue, leistungsfähige Methoden zur Trennung und Bestimmung von Enantiomeren zu entwickeln.

6.1.1 Chirale Arzneistoffe – Pharmakokinetik und Pharmakodynamik

Rund ein Viertel der chiralen Wirkstoffe wird heutzutage in Form des racemischen Gemisches in den Handel gebracht. Dabei unterscheiden sich die beiden Enantiomere häufig in ihren pharmakodynamischen und pharmakokinetischen Eigenschaften. Zu einem beachtlichen Teil beruht die gewünschte pharmakologische Wirkung auf der Aktivität eines der Enantiomere. In einigen Fällen sind darüber hinaus schwere Nebenwirkungen racemischer Gemische beschrieben worden, die durch eines der Enantiomere hervorgerufen werden, obwohl das andere bei sehr günstigem Risiko-Nutzen-Profil eine hohe Wirksamkeit aufweist (z.B. Penicillamin [14], Thalidomid [10]). Selbst wenn die unerwünschten Arzneimittelwirkungen des unwirksamen Enantiomeres tolerierbar sind, stellt der Metabolismus des inaktiven Enantiomers eine unnötige Belastung des Organismus dar.

Daher wird die Verwendung des pharmakologisch wirksamen Enantiomers in reiner Form aus heutiger Sicht als Goldstandard angesehen. Die Entwicklung von analytischen Methoden zur Trennung und Bestimmung von Enantiomerenpaaren zur Kontrolle von Syntheseschritten, zur Reinheitsbestimmungen und im Rahmen pharmakologischer Studien gewinnen dabei zunehmend an Bedeutung. Forschende Arzneimittelunternehmen sind bestrebt, stereoselektive Reaktionen zu entwickeln, um das reine, pharmakologisch wirksame Enantiomer zu synthetisieren. Dennoch können enantiomere Verunreinigungen bei diesen Reaktionen nicht ausgeschlossen werden [114] und erfordern qualitative und quantitative Kontrollen.

6.1.2 Methodenvergleich

Enantiomerenpaare sind aufgrund ihrer gleichen chemischen und physikalischen Eigenschaften (z. B.: Dichte und Siedepunkt) nur schwer aufzutrennen. Sie unterscheiden sich ausschließlich in zwei Eigenschaften:

1. In der Richtung, in der sie linear polarisiertes Licht drehen.
2. In ihrem Verhalten in chiralen Umgebung.

Der erste Schritt zur Auftrennung von Enantiomeren ist die Reaktion zu Diastereomeren. So besteht die Möglichkeit, Enantiomere mit einem chiralen Reagenz (enantiomerenrein) zu derivatisieren. Die so gewonnenen Diastereomerenpaare besitzen unterschiedliche physikalische Eigenschaften, was die Voraussetzung für eine Trennung der Paare ist. Eine zweite, weit häufiger angewendete Methode ist die Erzeugung von diastereomeren Übergangszuständen, verursacht durch Wechselwirkungen mit chiralen Selektoren. In der Literatur sind verschiedene chromatographische Analysenverfahren zur Durchführung von chiralen Trennungen beschrieben [47], wie die Hochleistungsflüssigchromatographie, sowohl die Umkehrphasen- [19-24, 115], als auch die Normal-Phasen-Chromatographie [25-29], die Superkritische Flüssigchromatographie [30-33] und die Kapillarelektrophorese [34, 36-46].

In den vergangenen Jahren hat sich die Kapillarelektrophorese als valides Verfahren zur Trennung von chiralen Substanzen erwiesen. Dabei stellen das hohe Maß an Flexibilität vor allem in der Methodenentwicklung und die herausragende Trennleistung die größten Vorteile dieser Technik dar. Die kurzen Analysen- und Equilibrierungszeiten bei Parameterwechsel sind weitere Vorzüge. Obwohl reine, gut charakterisierte chirale Selektoren zum Teil sehr teure Substanzen sind, ermöglicht die CE die Verwendung von diesen Stoffen, da nur geringe Probenmengen und Trennpufferlösungen (geringes Kapillarvolumen (2.1.1.1)) benötigt werden.

6.1.3 Methoden zur chiralen Trennung mittels CE

Generell sind auch in der Kapillarelektrophorese sowohl direkte als auch indirekte Methoden zur Bildung der erforderlichen Diastereomerenpaare anwendbar. Die indirekte Methode basiert auf der Bildung stabiler Diastereomere nach Derivatisierung mit Hilfe eines chiralen Reagenz (6.1.2). Diese Diastereomere können dann mit Hilfe eines achiralen Hintergrundelektrolyten (BGE) aufgetrennt werden. Nachteile sind auch in der CE die hohen Anforderungen an das Derivatisierungsreagenz [51] und der Zeitaufwand der Derivatisierungsreaktionen, für die spezielle Reaktionsgruppen (Amino- und Carboxygruppen) benötigt werden [34]. Außerdem können während der Derivatisierungsprozesse Racemisierungen stattfinden.

Die weitaus etabliertere Methode in der CE ist die direkte chirale Bestimmung, da hier die oben genannten Nachteile nicht bestehen. Durch Zugabe chiraler Selektoren zum achiralen Hintergrundelektrolyten können Enantiomere voneinander getrennt und bestimmt werden. Als chirale Selektoren können Gallensalze und bestimmte Antibiotika (z.B. Streptomycin) verwendet werden. Am häufigsten kommen aber Cyclodextrine (CDs) als Selektoren zum Einsatz [116, 117].

Die Verwendung von CDs in der Kapillarelektrophorese ist mittlerweile die bevorzugte Methode zur Trennung von chiralen Substanzen. Der innere Hohlraum der CDs ist relativ hydrophob und besitzt die Fähigkeit zur Bindung von Molekülen verschiedener Substanzklassen, aber insbesondere von Substanzen, die mit unpolaren Gruppen ausgestattet sind. Die Außenseite hingegen ist relativ hydrophil, da auf der Oberfläche Hydroxylgruppen (primäre und sekundäre OH-Gruppen) vorhanden sind, dadurch ist die Außenseite fähig Wechselwirkungen mit hydrophilen Molekülbestandteilen einzugehen. Wenn chirale Arzneistoffmoleküle entweder in Wechselbeziehung mit der Außenseite treten oder im Hohlraum gebunden werden, besitzt jede dieser beiden entstehenden Formen individuelle Bindungseigenschaften, die sich in unterschiedlichen Bindungskonstanten widerspiegeln.

Durch Modifizierung und Derivatisierung der oberflächenständigen Hydroxylgruppen der nativen Cyclodextrine können verschieden geladene CDs mit chemisch unterschiedlichen Gruppen dargestellt werden. Heute ist eine große Zahl an

Cyclodextrinderivaten verfügbar, die eine große Auswahl zur Bearbeitung verschiedenster analytischer Trennprobleme bietet. Neben der klassischen Kapillarelektrophorese, in der wässrige Pufferlösungen zum Einsatz kommen, können bei der Wahl geeigneter Puffersysteme auch nichtwässrige Systeme zur Anwendung kommen. Die nichtwässrige Kapillarelektrophorese (nonaqueous capillary electrophoresis, NACE) erweitert die Anwendbarkeit der Kapillarelektrophorese zur Enantiomerentrennung bezüglich der Löslichkeit der Analyten und zeigt ein breites Spektrum an physikochemischen Parametern (z. B.: Dielektrizitätskonstante und Viskosität), die einen direkten Einfluss auf die elektrophoretische Mobilität besitzen [118].

6.1.4 Strategien in der Methodenentwicklung

Die allgemeinen Strategien zur chiralen Trennung [43, 119-121] beruhen auf zwei grundlegenden Schritten. Als erstes werden die Ausgangsbedingungen der Methode zur Trennung der Enantiomere untersucht und definiert. Im Fokus steht dabei die Identifizierung eines geeigneten chiralen Selektors. Im zweiten Schritt werden die erhaltenen Ausgangsbedingungen optimiert. Ziel ist dabei die Trennleistung (Auflösung) bei möglichst kurzer Analysenzeit zu erhöhen. Die wichtigsten Faktoren, die optimiert werden, sind die Konzentration des chiralen Selektors, der pH-Wert des Puffers (BGE) und die Zugabe organischer Lösungsmittel.

Der erweiterte Ansatz unserer Arbeit war die Untersuchung der Methodenparameter und die Definition der Anforderungen zur Quantifizierung von enantiomeren Verunreinigungen. Eine eindeutige Definition der zu berücksichtigenden Parameter zusammengefasst in einer gegliederten Strategie zur Methodenentwicklung erhöht die Effizienz und verbessert die Effektivität während der ersten beiden Entwicklungsschritte. Die Fokussierung auf die anschließende Quantifizierung der enantiomeren Verunreinigung sollte bewirken, dass schon früh in der Methodenentwicklung Leistungsmerkmale der chiralen Trennmethode definiert werden, die es ermöglichen diese Methode für die Quantifizierung zu nutzen, ohne das weitere zeitaufwendige und kostenintensive Entwicklungsschritte erforderlich sind.

6.1.5 Anforderungen gemäß ICH-Qualitäts-Guidelines [67]

In 6.1.1 sind verschiedene Beispiele aufgeführt, die verdeutlichen, dass eine enantiomere Verunreinigung mit gleicher analytischer Sicherheit (Parameter zur Validierung Analytischer Methoden beschrieben in ICH Q2 (R1) [122]) auszuschließen ist, wie Verunreinigungen, die nach ICH Q3A und Q3B (R2) [123, 124] klassifiziert sind. Die Klassifizierung enantiomerer Verunreinigungen und die damit verbundenen analytischen Anforderungen erfolgen gemäß ICH Q6A [125], visualisiert in Decision Tree #5 (Abbildung 44).

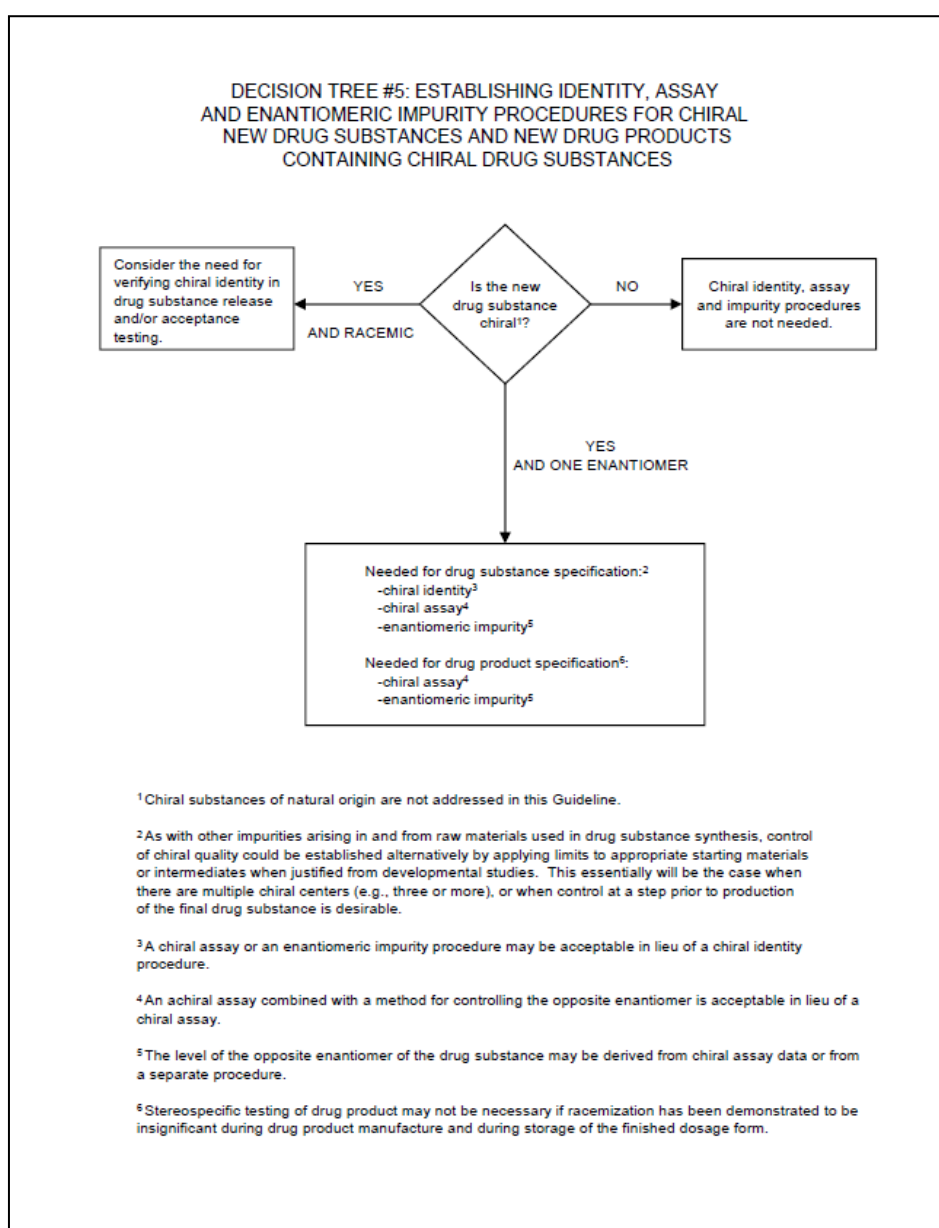


Abbildung 44: Decision Tree #5 aus [2, 125])

Unter Beachtung der ICH – Richtlinien wird eine Quantifizierung der enantiomeren Verunreinigungen bis zu einem Grenzwert von 0,1 % in Bezug auf den Hauptbestandteil empfohlen. Dies ist nur bei einer ausreichenden Trennung der beiden Enantiomere zu erreichen. Zusätzlich wird ein hohes Signal-Rausch-Verhältnis gefordert, da dieses nötig ist, um eine möglichst geringe Bestimmungsgrenze zu erzielen.

6.2 Screening

6.2.1 Auswahl der chiralen Selektoren

Die Auswahl der Selektoren orientierte sich an verschiedenen Faktoren [119]. So wurden bei der Wahl zunächst ganz allgemeine Aspekte berücksichtigt (Tabelle 5). Für die Entwicklung leistungsfähiger und effektiver Trennmethode müssen chirale Selektoren stereoselektiv diastereomere Übergangszustände mit den jeweiligen Enantiomeren ausbilden. Die zu verwendenden CDs müssen im BGE eine ausreichende Löslichkeit besitzen und stabil sein. Eine geringe Eigenabsorption (zu berücksichtigen bei Einführung von UV-aktiven Resten) und ein schnelles Einstellen des kinetischen Gleichgewichts bei der Komplexbildung sind außerdem Grundvoraussetzungen. Ein wichtiger Aspekt ist die Verfügbarkeit in möglichst gleichbleibender Qualität und eine lange Haltbarkeit der chiralen Selektoren. Deshalb wurden unsubstituierte, native Cyclodextrine (α -Cyclodextrin, β -Cyclodextrin, γ -Cyclodextrin) von Anfang an bei der Suche nach geeigneten chiralen Selektoren mitberücksichtigt. Die Möglichkeiten zur Ausbildung von Wechselwirkungen sind für neutrale Cyclodextrine geringer als bei derivatisierten CDs und somit bestehen nur geringe Chancen für eine initiale Trennung während des Screenings. Durch die flexiblen Wechselmöglichkeiten in der CE kosten die zusätzlichen Läufe kaum Zeit, so dass sich der zusätzliche Aufwand lohnt. Eine erfolgreiche Trennung mit nativen CDs kann zu sehr robusten Methoden führen. Substituierte CDs sind hingegen je nach Reinheitsgrad (isomerenrein) und nach Substitutionsgrad nur schwer in gleichbleibender Qualität zu bekommen und entsprechend teuer. Die Auswahl der im Screening verwendeten Selektoren deckt ein breites Spektrum verschieden geladener und substituierter CDs ab: Hydroxypropyl- α -Cyclodextrin, Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin, Hydroxypropyl- γ -Cyclodextrin, Carboxymethyl- β -Cyclodextrin, hoch sulfatisiertes α -Cyclodextrin, hoch sulfatisiertes- β -Cyclodextrin

und hoch sulfatisiertes γ -Cyclodextrin, sowie quartäres β -Cyclodextrin (QA-CD I oder kationisches-CD-I), 6-Monodeoxy-6-monoamino- β -Cyclodextrin (QA-CD II oder kationisches CD-II) und in Ergänzung Succinyl- β -Cyclodextrin (8.4).

6.2.2 Auswahl der Methodenparameter und Durchführung des Screenings

Die angewendeten Methodenparameter zur Durchführung des Arzneistoffscreenings basieren auf Angaben und Beschreibungen in bereits veröffentlichten Untersuchungsstrategien [116, 120, 126-131]. Ebenso orientiert sich die Auswahl der zu untersuchenden chiralen Arzneistoffe an in der Literatur beschriebenen Trennbeispielen. Folgende Arzneistoffe sind im Rahmen des Screenings untersucht worden:

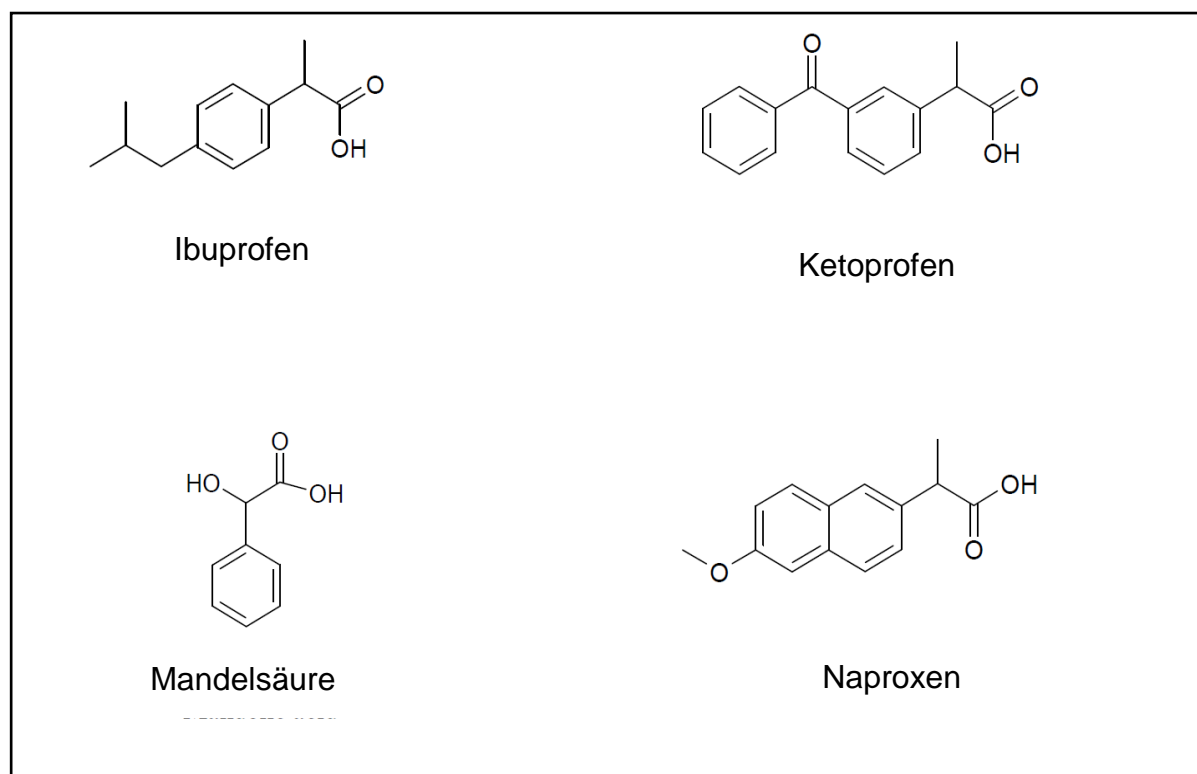


Abbildung 45: Strukturen der chiralen Substanzen, die im Rahmen des Screenings untersucht wurden

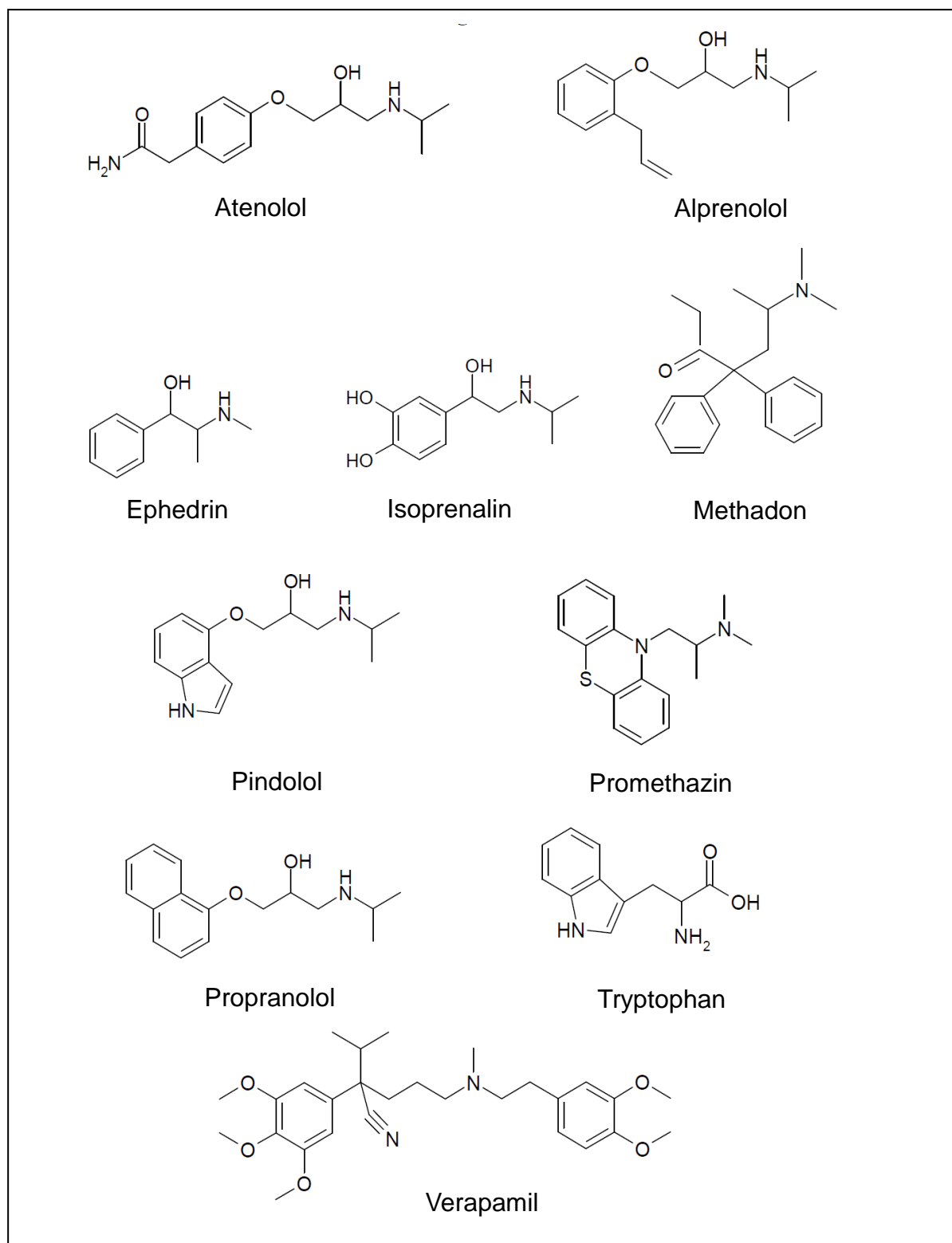


Abbildung 46: Strukturen der basischen chiralen Substanzen, die im Rahmen des Screenings untersucht wurden

6 Bestimmung der enantiomeren Verunreinigungen

Zu Beginn des Screenings wurde der Effekt des Stackings für jeden Puffertypen untersucht. Dabei wurde von einer Pufferkonzentration von 100mM und einer Probenpufferlösung von 10mM ausgegangen. Zunächst war es infolge der Wärmentwicklung erforderlich, die Fließpuffer-Konzentration auf 50mM und die Konzentration des Probenpuffers auf 5mM zu reduzieren. Es wurde keine weitere Verbesserung durch Stackingeffekte beobachtet, auch bei Verwendung von Wasser als Fließmittel anstelle des 5mM Puffers, so dass die Probenpufferkonzentration von 5mM beibehalten wurde. Dadurch konnte die Löslichkeit der Probe, im Gegensatz zur Verwendung reinen Wassers, entscheidend verbessert werden.

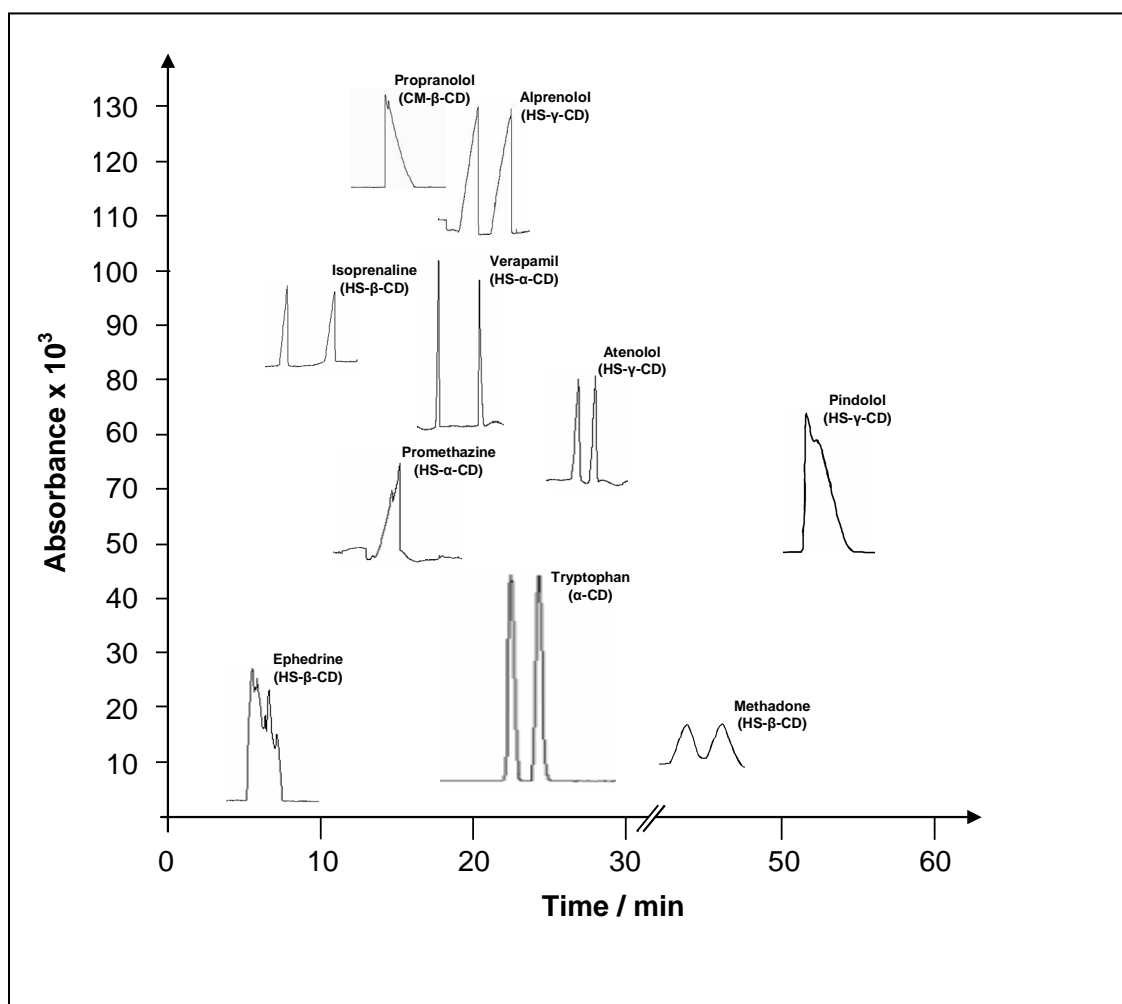


Abbildung 47: Übersicht über die erhaltenen Trennungen nach dem Screening

6 Bestimmung der enantiomeren Verunreinigungen

Unter den definierten Bedingungen (8.5.3) konnten im Verlauf des Screenings akzeptable Trennungen erreicht werden (Abbildung 47; Tabelle 20 bis Tabelle 22). Deren Auswertung ergab, dass die Anwendung des sogenannten Umkehr-Modus (Auftrennung in Richtung der Anode, Abbildung 22D) die zu bevorzugende Herangehensweise darstellt, so dass dieses Verfahren in der zukünftigen Methodenentwicklung neben der Trennung im Normal-Modus (Abbildung 22) besonders zu beachten ist.

Insgesamt zeigten die Ergebnisse, dass die Verfahren und Strategien auch in Bezug auf die ersten Entwicklungsschritte im Rahmen des Screenings noch deutlich verbessert werden können. Die Verbesserung des Screening-Prozesses war nicht im Fokus dieser Arbeit und wurde daher nicht weiter verfolgt.

6.2.3 Ergebnisse des Screenings

Die Ergebnisse des Screenings sind in drei nachfolgenden Tabellen aufgeführt (Tabelle 20 bis Tabelle 22). Die Angabe (+) hinter dem jeweiligen Wert zur Auflösung bedeutet, dass die Trennung unter den Bedingungen Normaler Polarität erfolgte. Die Angabe (-) kennzeichnet Ergebnisse, die mit dem Umkehr-Modus aufgenommen worden sind (25/-25 kV; 50mbar; 18 Sek.; 25°C, (Man delsäure: 18°C); (8.5.3)).

Tabelle 20 Screening Ergebnisse – Teil 1				
CD Type	Ibuprofen	Ketoprofen	Mandelsäure	Naproxen
QA-CD I	kein Peak	kein Peak	kein Peak	kein Peak
QA-CD II	kein Peak	Peak mit Schulter	$R_s = 1.1 (+)$	Peak mit Schulter

Tabelle 21 Screening Ergebnisse – Teil 2

CD Type	Atenolol	Alprenolol	Ephedrin	Isoprenalin	Methadon
α -CD	ein Peak (+)	kein Peak	kein Peak	kein Peak	kein Peak
β -CD	kein Peak	kein Peak	kein Peak	kein Peak	kein Peak
γ -CD	kein Peak	kein Peak	kein Peak	kein Peak	kein Peak
HP- α -CD	kein Peak	kein Peak	kein Peak	kein Peak	ein Peak (+)
HP- β -CD (Supelco)	kein Peak	kein Peak	kein Peak	kein Peak	zwei Peaks (+)
HP- β -CD (Sigma)	ein Peak (+)	kein Peak	kein Peak	$R_s = 1,10$ (+)	zwei Peaks (+)
HP- γ -CD	kein Peak	kein Peak	kein Peak	$R_s = 1,40$ (+)	kein Peak
CM- β -CD	kein Peak	kein Peak	kein Peak	$R_s = 1,17$ (+)	kein Peak
CM- γ -CD	kein Peak	kein Peak	kein Peak	$R_s = 1,18$ (+)	kein Peak
HS- α -CD	Peak mit 3 Spitzen (+)	$R_s = 1,53$ (-)	kein Peak	kein Peak	kein Peak
HS- β -CD (Supelco)	Peak mit 2 Spitzen (+) $R_s = 0,79$ (-)	$R_s = 1,92$ (-)	Peak mit 2 Spitzen (+)	kein Peak	kein Peak
HS- β -CD (Sigma)	$R_s = 0,67$ (-)	zwei Peaks; einer mit 2 Spitzen $R_s = 1,4$	Peak mit 2 Spitzen(+)	ein Peak (+) $R_s = 5,74$ (-)	zwei Peaks (+)
HS- γ -CD	$R_s = 2,54$ (-)	$R_s = 1,93$ (-)	kein Peak	kein Peak	kein Peak
α -CD (phosphatiert)	kein Peak	zwei Peaks $R_s = 0,65$ (+)	kein Peak	kein Peak	kein Peak
β -CD (phosphatiert)	kein Peak	kein Peak	kein Peak	kein Peak	kein Peak
γ -CD (phosphatiert)	kein Peak	kein Peak	kein Peak	kein Peak	kein Peak
Succinyl- β -CD	kein Peak	kein Peak	kein Peak	kein Peak	kein Peak

Tabelle 22 Screening Ergebnisse – Teil 3

CD Type	Pindolol	Promethazin	Propranolol	Tryptophan	Verapamil
α -CD	kein Peak	kein Peak	kein Peak	$R_s = 2,45$	kein Peak
β -CD	kein Peak	kein Peak	kein Peak	kein Peak	kein Peak
γ -CD	kein Peak	kein Peak	kein Peak	kein Peak	kein Peak
HP- α -CD	kein Peak	kein Peak	kein Peak	kein Peak	ein Peak (+)
HP- β -CD (Supelco)	kein Peak	kein Peak	kein Peak	kein Peak	Peak mit Schulter (+)
HP- β -CD (Sigma)	kein Peak	kein Peak	kein Peak	kein Peak	ein Peak (+)
HP- γ -CD	kein Peak	kein Peak	kein Peak	kein Peak	ein Peak (+)
CM- β -CD	Peak mit Schulter (+)	kein Peak	Peak mit 2 Spitzen (+)	$R_s = 0,4$	kein Peak
CM- γ -CD	kein Peak	kein Peak	Peak mit 2 Spitzen(+)	kein Peak	kein Peak
HS- α -CD	kein Peak	Peak mit 2 Spitzen (-)	kein Peak (-)	Kein Peak	$R_s = 10,2$ (-)
HS- β -CD (Supelco)	kein Peak	Peak mit Schulter (-)	ein Peak (-)	Kein Peak	$R_s = 1,56$ (-)
HS- β -CD (Sigma)	ein Peak, gespalten (-)	kein Peak	ein Peak (-)	zwei Peaks, unförmig	$R_s = 7,42$ (-)
HS- γ -CD	zwei Peaks, unförmig (-)	kein Peak	ein Peak (-)	kein Peak	$R_s = 6,98$ (-)
α -CD (phosphatiert)	kein Peak	kein Peak	kein Peak	kein Peak	kein Peak
β -CD (phosphatiert)	kein Peak	kein Peak	kein Peak	kein Peak	kein Peak
γ -CD (phosphatiert)	kein Peak	kein Peak	kein Peak	kein Peak	kein Peak
Succinyl- β -CD	kein Peak	kein Peak	kein Peak	kein Peak	Peak mit 2 Spitzen (+)

6.3 Optimierung

6.3.1 Ziel der Optimierung [132]

Der erste Schritt, das Screening der Arzneistoffe, hatte zum Ziel den jeweiligen chiralen Selektor zu ermitteln, um eine initiale Auftrennung der Enantiomeren zu erreichen und die Startbedingungen für die folgenden Entwicklungsschritte zu definieren. Ausgehend von den initialen Trennungen wurden die Methodenparameter weiter optimiert, um präzise Methoden zur Bestimmung der enantiomeren Verunreinigung zu entwickeln. In diesem letzten Schritt wurde die Hauptkomponente im Überschuss zugesetzt, um im Verhältnis dazu die Verunreinigung in geringer Konzentration bestimmen zu können (Niedrige DL/QL [132]). Das Arbeiten mit einem solchen Konzentrationsüberschuss hat eine starke Peakverbreiterung und eine Minderung der Auflösung zur Folge. Das erfordert als Voraussetzung, dass im vorhergehenden Schritt während der Optimierung der Methode eine sehr hohe Auflösung erreicht wurde, um eine spätere Überlappung der Peaks zu vermeiden. Außerdem war ein Teil der Methodenentwicklung zur Bestimmung der enantiomeren Verunreinigung die Definition eines Mindestwertes für die erforderliche Auflösung.

Um die Leistungsfähigkeit der Methode bezüglich der Trennparameter Auflösung und Analysenzeit zu verbessern, wurden Methodenparameter wie die Konzentration des chiralen Selektors, der *pH*-Wert des Puffers und die Konzentration von organischen Zusätzen (Lösungsmittel) variiert.

Grundsätzlich kann zwischen primärer und sekundärer Optimierung unterschieden werden. Die primäre Optimierung beinhaltete die Feinjustierung der CD-Konzentration in den Grenzen von 2 - 20 % [42, 133], die Suche nach Zusätzen von organischen Bestandteilen zum Puffer (z.B. Methanol) [134, 135], die Änderung des Puffers bezüglich seines *pH*-Wertes [136] und die Verwendung von CD-Gemischen in einem dualen System [60, 137-140]. Darüber hinaus wurden verschiedene Zusätze wie Amine oder Cellulosederivate zum Puffer gegeben, um die Selektivität der Trennung durch Änderung der elektrophoretischen Mobilität zu variieren [19].

Die sekundäre Optimierung umfasst Untersuchungen zur Festlegung einer geeigneten Analytenkonzentration (hinreichendes S/N bei akzeptabler R_s). Die Kontrolle der Ionenstärke der Prüflösung ist ein nächster Optimierungsschritt, um den

Effekt des Stackings zu erhöhen. Abschließend wird der optimale Wert der Stromspannung definiert, um bei höherer Volt-Zahl die Migrationszeit verkürzen zu können.

6.3.2 Abfolge der Methodenentwicklung:

- I. Screening (6.2)
- II. Optimierung, prim.:
 - II.1. Konzentration der Pufferlösung (Razemat)
 - II.2. pH-Wert der Pufferlösung (6.3.3)
 - II.3. Cyclodextrin-Konzentration (6.3.4)
 - II.4. Zugabe organischer Lösungsmittel (6.3.5)
- III. Optimierung, sek.:
 - III.1. Masseüberladung (Peak-Overload) (Single Isomers)
 - III.2 Feinjustierung der Methodenparameter (z.B.: Ionenstärke und Stromspannung)

6.3.3 Variation des Puffer pH – Wertes

Für die drei gewählten Arzneistoffe (Atenolol, Isoprenalin und Verapamil) wurde eine Untersuchung des Trennpuffers bezüglich des pH-Wertes durchgeführt, indem folgende pH-Werte geprüft wurden: pH 2,5; 3,0; 3,5; 5,0 und 8,0. Für diese drei Enantiomerenpaare wurde der ideale pH-Wert von 2,5 zur bestmöglichen Trennung ermittelt, dabei wurden sowohl gute Werte für die Auflösung als auch akzeptable Analysenzeiten erreicht. Bei höheren pH-Werten zwischen 5 und 8 wurden bei Untersuchung der drei Substanzen keine Peaks detektiert. Dies lässt sich dadurch erklären, dass basische Enantiomere bei Lösung in Puffern mit hohen pH-Werten dazu neigen, auszufallen. Zudem führt der Verlust der Ladungen im Molekül zu einer langsameren Migration der Analyten bzw. des Analyten-CD-Komplexes.

6.3.4 Cyclodextrin – Konzentration

Für alle untersuchten Arzneistoffe wurden optimale Konzentrationen der eingesetzten Cyclodextrine in einem Bereich von 1 bis 5 % ermittelt. Bei höheren Konzentrationen verschlechterte sich die Auflösung deutlich. Dies deutet darauf hin, dass die Konzentration derivatisierter CDs die 5 % nicht überschreiten sollte, um eine optimale Trennung zu gewährleisten. Der Einfluss der CD-Konzentration auf die elektrophoretische Mobilität der Analyten führt zum Teil zur Änderung der Migrationsreihenfolge der Enantiomere. [132, 141]

6.3.5 Zusatz von organischen Lösungsmitteln

Durch Zugabe des Methanols zum Trennpuffer konnte die Auflösung für alle Analyten deutlich verbessert werden, und zwar signifikant über die Werte, die nur durch Änderung des pH-Werts des Puffers erreicht worden waren. Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Zugabe eines organischen Lösungsmittels zum HGE, wie zum Beispiel Methanol, zu einem der folgenden Effekte führen kann:

1. Eine Erhöhung der Viskosität kann zu einer geringeren Migrationsgeschwindigkeit führen und somit die Auflösung verbessern.
2. Es kann eine verbesserte Löslichkeit des Analyten erzielt werden.
3. Es werden vor allem die hydrophoben Interaktionen zwischen Analyt und Cyclodextrin beeinflusst. Dabei führt die Erzeugung einer Konkurrenz zwischen organischem Lösungsmittel und Analyt in Bezug auf die hydrophobe Bindungsstelle des CDs (innerer Hohlraum) zu einer geringeren Affinität des Analyten zum CD.
4. Für ionische und generell hydrophile Wechselwirkungen zwischen Analyt und CD erfolgt durch den Zusatz eine Verstärkung der Affinität, da die Bindungskräfte erhöht werden.

6.3.6 Methodenoptimierung zur Trennung basischer Enantiomerenpaare

In diesem Abschnitt wird die Optimierung der Enantiomerentrennung am Beispiel des Atenolol beschrieben. Die beste Trennung im Rahmen des Screenings wurde unter Verwendung einer zweiprozentigen HS- γ -CD-Phosphatpuffers pH 2,5 erhalten, dabei wurde ein Wert für R_s von 2,69 für die Auflösung erreicht (Abbildung 48).

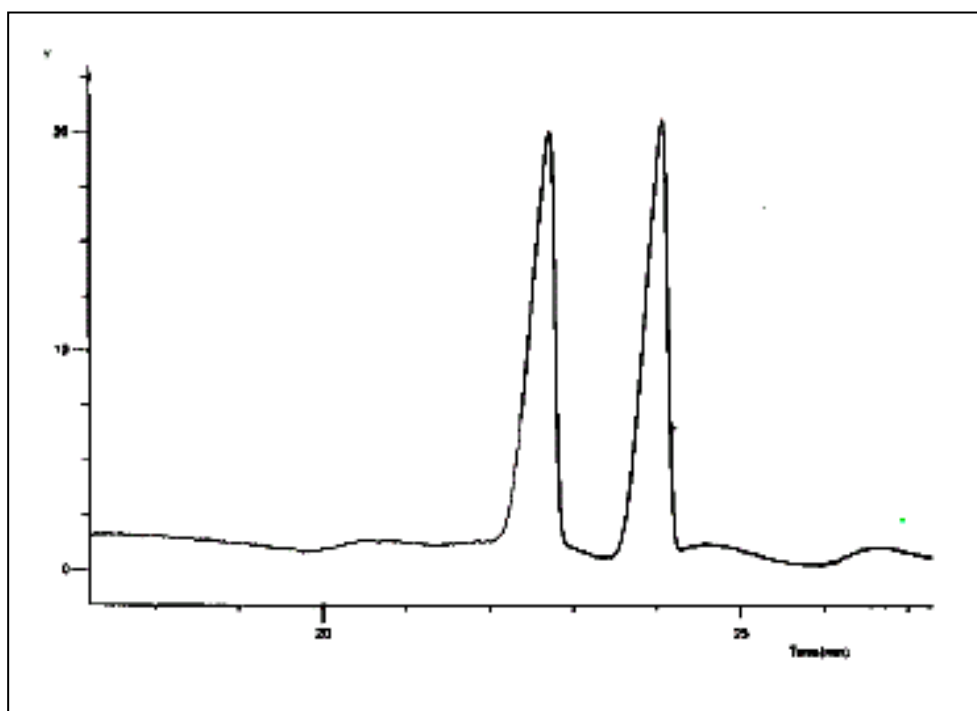


Abbildung 48: Auftrennung Atenolol nach dem Screening, Methode gemäß 6.2.2

Im nächsten Schritt (II.1.) wurde der Einfluss der Pufferkonzentration auf die Trennung untersucht: Geringere Konzentrationen (bis zu 10 mM) verminderten die Auflösung. Bei höheren Konzentrationen (bis zu 200 mM) verschlechterte sich die Robustheit innerhalb der Untersuchungsserie ($n = 10$) durch Anstieg des Widerstandes innerhalb des elektrischen Feldes infolge des Wärmeanstiegs in der Kapillare (5.4.1.1).

Im zweiten Schritt (II.2.) wurden Pufferlösungen mit verschiedener pH-Werte bis maximal 8,0 geprüft, darauf folgend (II.3.) der Einfluss verschiedener Cyclodextrin-Konzentrationen von 2 %, 5 %, 10 %, und 20 %. Die Ergebnisse dieser Modifikationen der Pufferlösung, bezüglich pH-Wert und CD-Konzentrationen und deren Einfluss auf die Enantiomerentrennung von Atenolol sind in Tabelle 23

aufgelistet. Eine Erhöhung des pH -Wertes spiegelte sich in einer geringeren Auflösung zwischen den einzelnen Enantiomeren wieder (Abbildung 49).

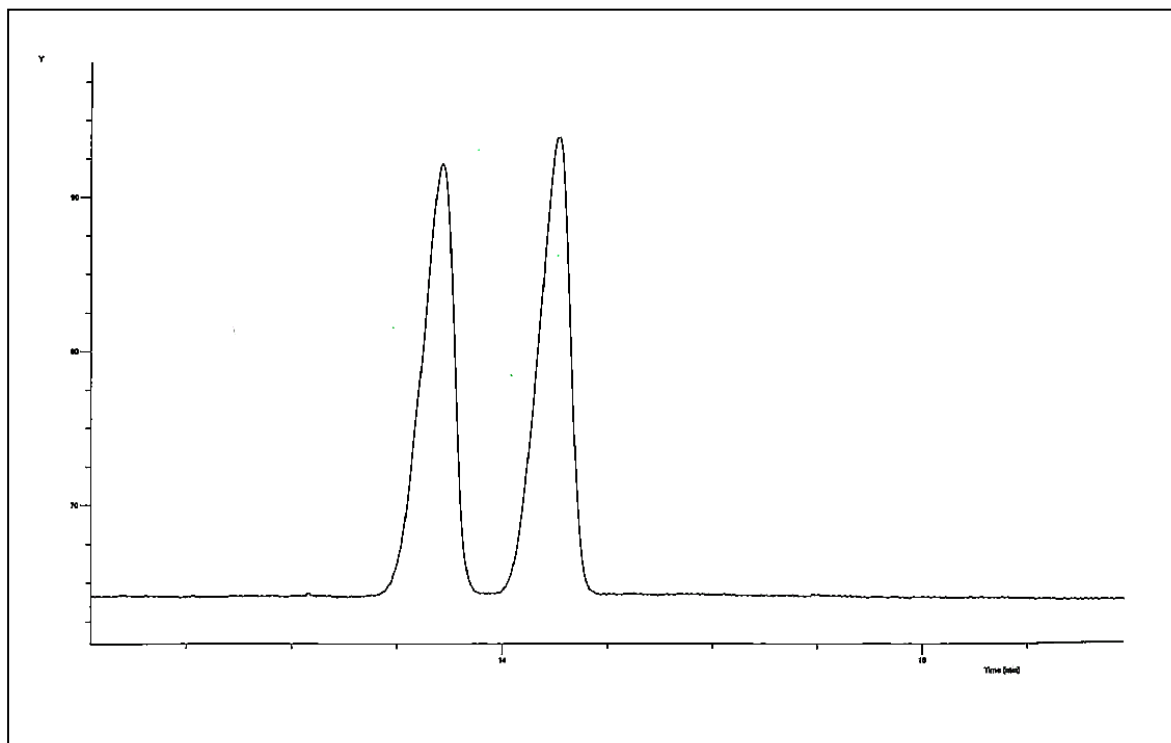


Abbildung 49: Auftrennung Atenolol, Methode gemäß 6.2.2 mit Phosphatpuffer pH 5,0 ($R_s < 2$)

Auch bei höheren CD-Konzentrationen wurden keine höheren Werte für die Auflösungen erzielt (Abbildung 50).

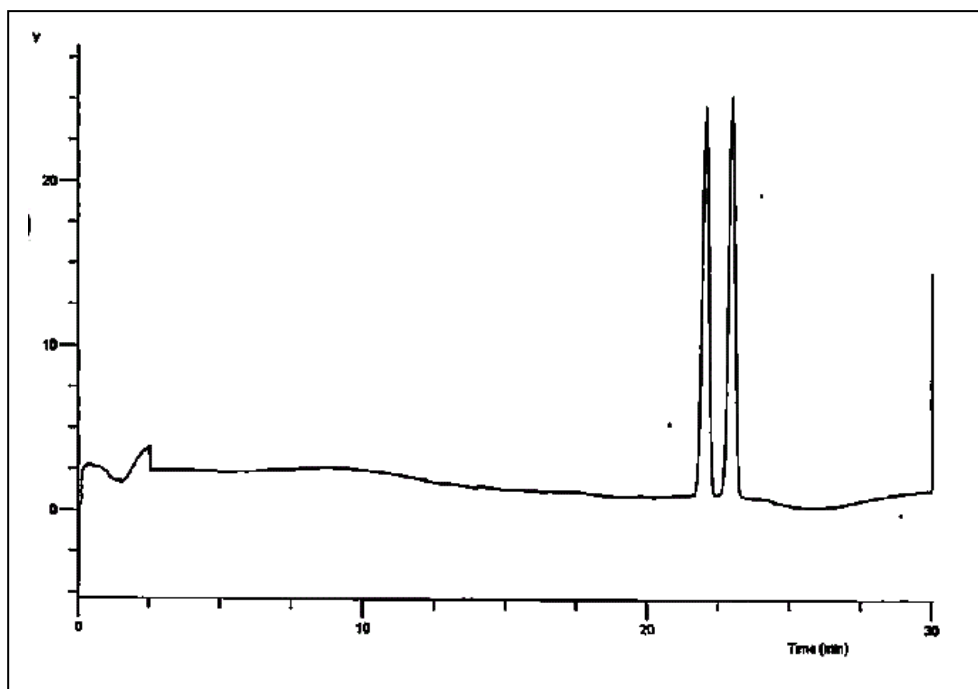


Abbildung 50: Auftrennung Atenolol, Methode gemäß 6.2.2 mit 10 %- HS- γ -CD-Phosphatpuffer pH 2,5

Als vierter Einflussparameter (II.4.) wurde die Zugabemenge organischer Lösungsmittel untersucht. Ein Zusatz von 5 % Methanol erhöhte die Auflösung (Tabelle 23). Der Wert für die Auflösung minderte sich bei einer weiteren Steigerung der Methanolkonzentration im Puffer auf 10 % deutlich. Daher wurden keine höheren Methanolkonzentrationen untersucht.

Für den abschließenden Entwicklungsschritt (Bestimmung der Verunreinigung) wurde eine zweiprozentige HS- γ -CD-Lösung in pH 2,5 Phosphatpuffer mit 5 % Methanol ($R_s = 3,35$) verwendet. Abbildung 51 zeigt das dazugehörige Elektropherogramm.

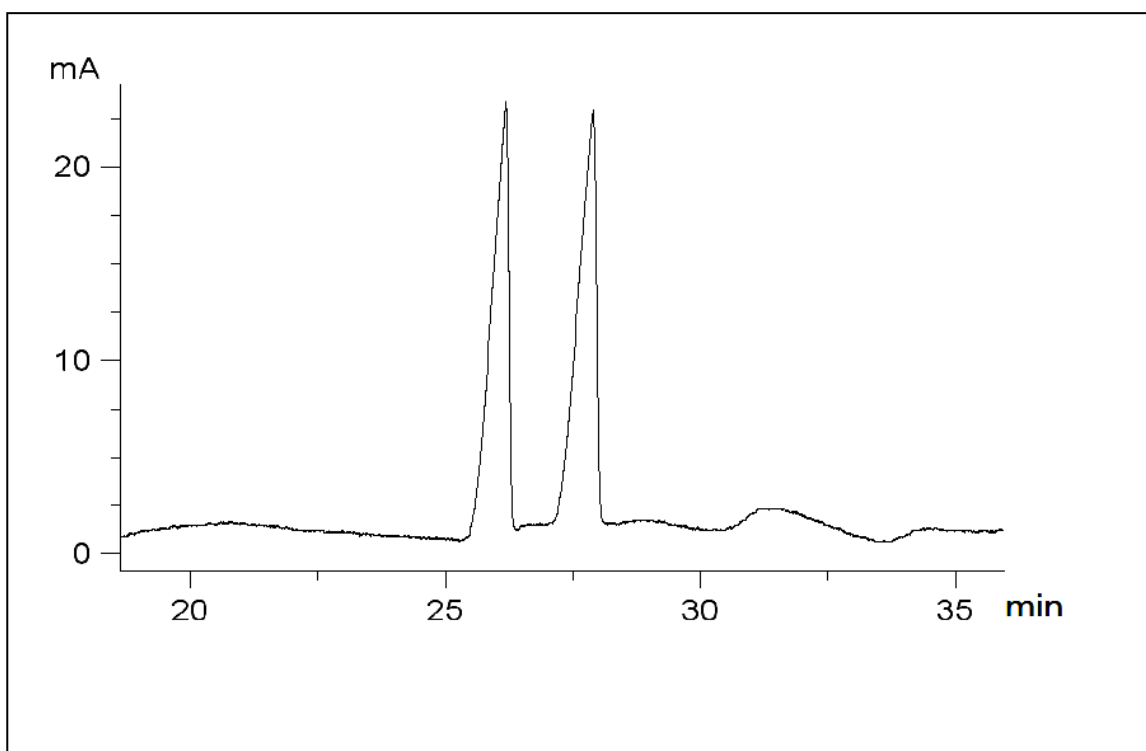


Abbildung 51: Auftrennung Atenolol nach Abschluss der Optimierung

Methodenbedingungen: 50 mM Phosphatpuffer pH (2,5); zweiprozentige HS- γ -CD-Lösung mit Zugabe von 5 % Methanol; Injektionsdruck: 50 mbar für 18 Sek.; Temperatur 25 °C; Kapillare: 85 cm, (31 cm zum Detektorfenster) x 50 μ m ID; Stromspannung: - 25 kV (Reversed polarity); UV-Detektion bei 200 nm.

Die Methode wurde außer für Atenolol auch für die Arzneistoffe Verapamil und Isoprenalin optimiert (II.1. bis II.4; 6.3.2). Die dazu gehörigen Ergebnisse der Optimierung sind in Tabelle 23 aufgeführt.

Tabelle 23		Optimierungsergebnisse der basischen Arzneistoffe		
Puffer	CD-Konzentration	Rs Atenolol	Rs Verapamil	Rs Isoprenalin
		HS- γ -CD	HS- α -CD	HS- β -CD*
Phosphat pH 2,5	2 %	2,69	10,19	5,74
	5 %	1,75	4,19	5,36
	10 %	2,15	kein Peak	kein Peak
TEA-Phosphat pH 2,5	2 %, 5 %, 10 %	kein Peak	kein Peak	kein Peak
Phosphat pH 3,0	2 %	kein Peak	nicht getestet	kein Peak
	5 %	2,49	nicht getestet	kein Peak
	10 %	2,18	nicht getestet	kein Peak
Phosphat pH 3,5	2 %	kein Peak	3,26	nicht getestet
	5 %	2,12	kein Peak	nicht getestet
	10 %	1,95	nicht getestet	nicht getestet
	20 %	2,18	nicht getestet	nicht getestet
Acetat pH 5,0	2 %, 5 %, 10 %	kein Peak	kein Peak	nicht getestet
Borat pH 8,0	2 %, 5 %, 10 %	kein Peak	nicht getestet	nicht getestet
Phosphat pH 2,5 mit 5 % MeOH-Zusatz	2 %	3,35	12,34	4,34
Phosphat pH 2,5 mit 10 % MeOH-Zusatz	2 %	3,15	12,30	nicht getestet

* = Lieferant Sigma

Pufferkonzentration: 50 mM, Stromspannung -25 kV (Reversed Polarity)

6.3.7 Methodenoptimierung zur Trennung saurer Enantiomerenpaare

Als Beispiel für saure Arzneistoffe wurde Mandelsäure ausgewählt, hier wurden die besten Trennergebnisse unter Verwendung des pH 6,0 Phosphatpuffers erzielt, bei einem einprozentigen Anteil an kationischen Cyclodextrin ($R_s = 1,1$). Die Auftrennung

erforderte die Verwendung eines Puffers bei pH 6, da die kationischen CDs nur eine Trennung herbei führen, wenn der pH-Wert kleiner als der pK_a -Wert (≈ 8) der CDs ist. Wie unter 6.3.6 beschrieben, wurden auch bei der aktuellen Methodenentwicklung die Optimierungsschritte eins bis vier zu Grunde gelegt (Ausnahme: Optimierungsschritt II.3., siehe unten). Neben einem größeren Temperatureinfluss kamen vor allem zwei Phänomenen Schlüsselrollen in der Methodenentwicklung in dieser Form zu, die bei Optimierung zur Trennung von basischen Enantiomerenpaaren (6.3.6) nicht zum Tragen kamen. So waren die Adsorption an den Kapillarwänden bei diesem Trennproblem und der Anteil der Verunreinigungen, der in den positiv geladenen Cyclodextrinen gefunden wurde, besonders kritisch. In reinerer Qualität sind diese CDs nicht verfügbar. Beides sind Faktoren, die einen Basisliniendrift fördern. Die enthaltenen Verunreinigungen führten zudem zu unregelmäßigen Extrapeaks. So war eine Erhöhung der Cyclodextrin-Konzentration als Optimierungsschritt (II.3.) von Beginn an ausgeschlossen. Die Zugabe von Methanol (5 %) führte zu einer signifikanten Steigerung der Auflösung ($R_s = 1,6$) und damit zu einer deutlichen Verbesserung der Reproduzierbarkeit der Trennung. Zusätzlich führte eine Verminderung der Temperatur auf 18°C zu symmetrischen und einheitlicheren Peakformen. Die erhaltenen Methodenparameter garantierten eine gute und reproduzierbare Trennung ($n = 20$; Tabelle 4), die als Basis verwendet werden konnte, um die enantiomere Verunreinigung (-) der Mandelsäure im folgenden Schritt zu bestimmen.

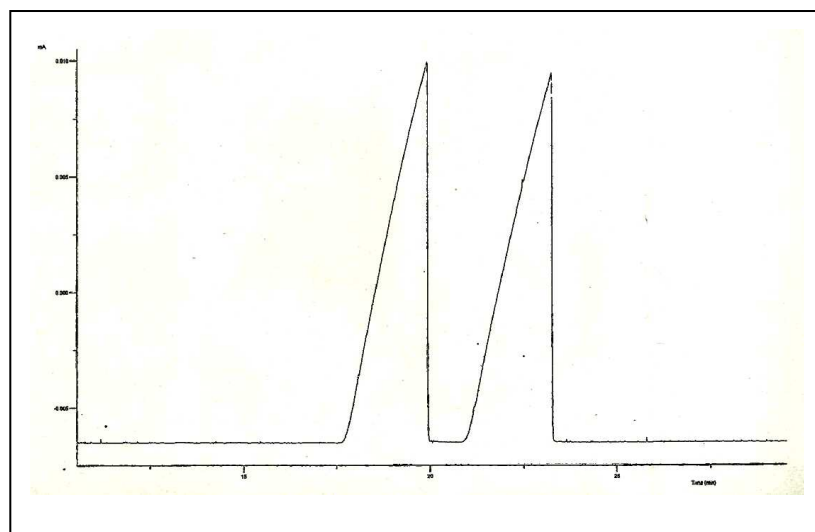


Abbildung 52: Auftrennung Mandelsäure nach Abschluss der Optimierung

6.4 Enantiomeren Bestimmung

Nach den Optimierungsschritten anhand der racemischen Gemische der Arzneistoffe, folgten darauf aufbauend die Untersuchungen der kleinst möglichen Bestimmungsgrenze des Distomers anhand der enantiomerenreinen Substanzen. Gemäß ICH-Guidelines (6.1.5; [67]) wird die Bestimmungsgrenze u. a. über das Signal-Rausch-Verhältnis definiert wird. Dieser sekundäre Optimierungsabschnitt (III.,6.3.2) wird nochmals anhand des Arzneistoffs Atenolol dargestellt. Verapamil, Isoprenalin und Mandelsäure wurden nach gleicher Vorgehensweise untersucht.

6.4.1 Überladung durch Volumenerhöhung

Das Signal-Rausch-Verhältnis kann durch verschiedene Techniken optimiert werden. Als erstes wurde in dieser Studie die Möglichkeit per Masse-Überladung (Peak-Overload) untersucht. Verschiedene Konzentrationen des (+)-Atenolol Enantiomers, welches um die 0,8 % (-)-Atenolol enthält, wurden bestimmt. So konnte die maximal mögliche injizierbare Masse (Injektionsvolumen) des Enantiomers bestimmt werden, bei der noch eine gute Basislinientrennung erzielt werden kann. Eine Konzentration von 2,0 mg/ml (+)-Atenolol wurde ermittelt als maximal mögliche injizierbare Konzentration ermittelt, ohne den Verlust einer reproduzierbaren, ausreichenden Basislinientrennung zwischen den beiden Enantiomeren zu detektieren (Abbildung 53).

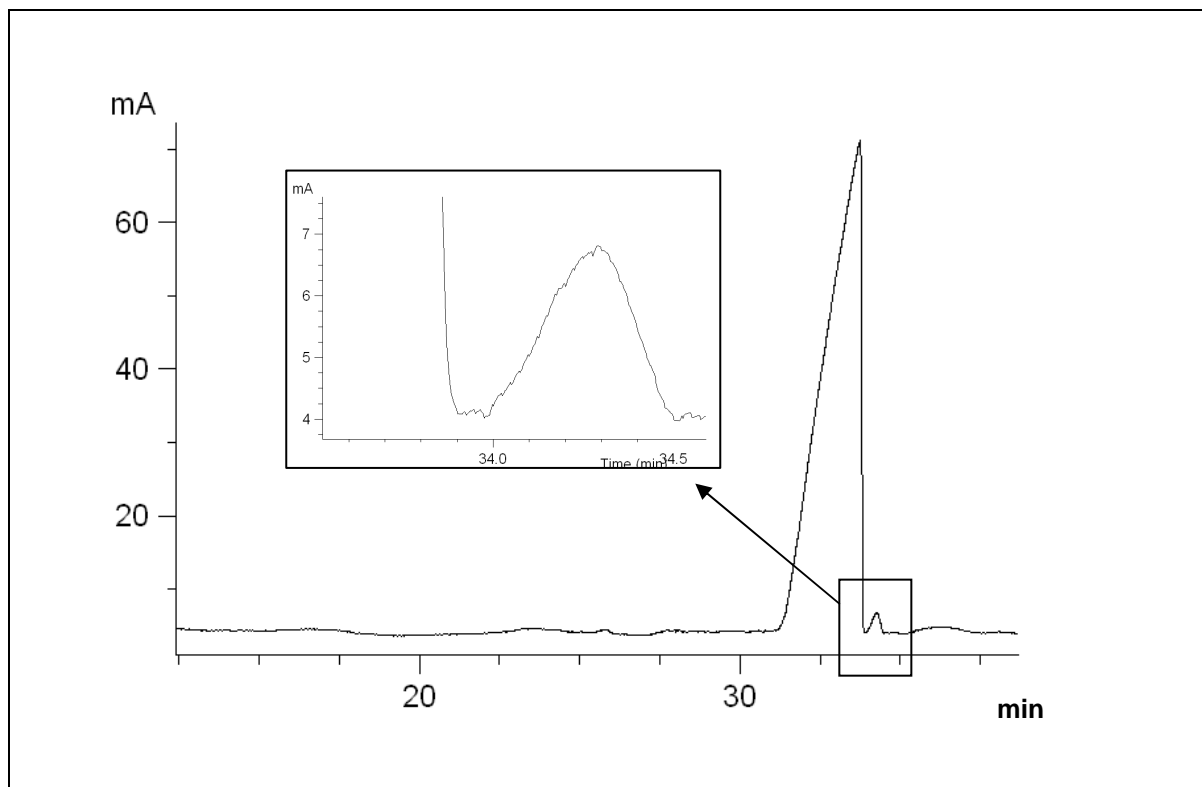


Abbildung 53: 2 mg/ml (+)-Atenolol; Methodenparameter wie zu Abbildung 51 beschrieben

Eine Injektion von 4,0 mg/ml erzeugte schlecht aufgelöste Peaks (Abbildung 54) und ab Konzentrationen von 3,0 mg/ml war die Basislinientrennung innerhalb von 20 Läufen nicht mehr gegeben (die Reproduzierbarkeit konnte nur innerhalb von 10 Läufen erhalten werden).

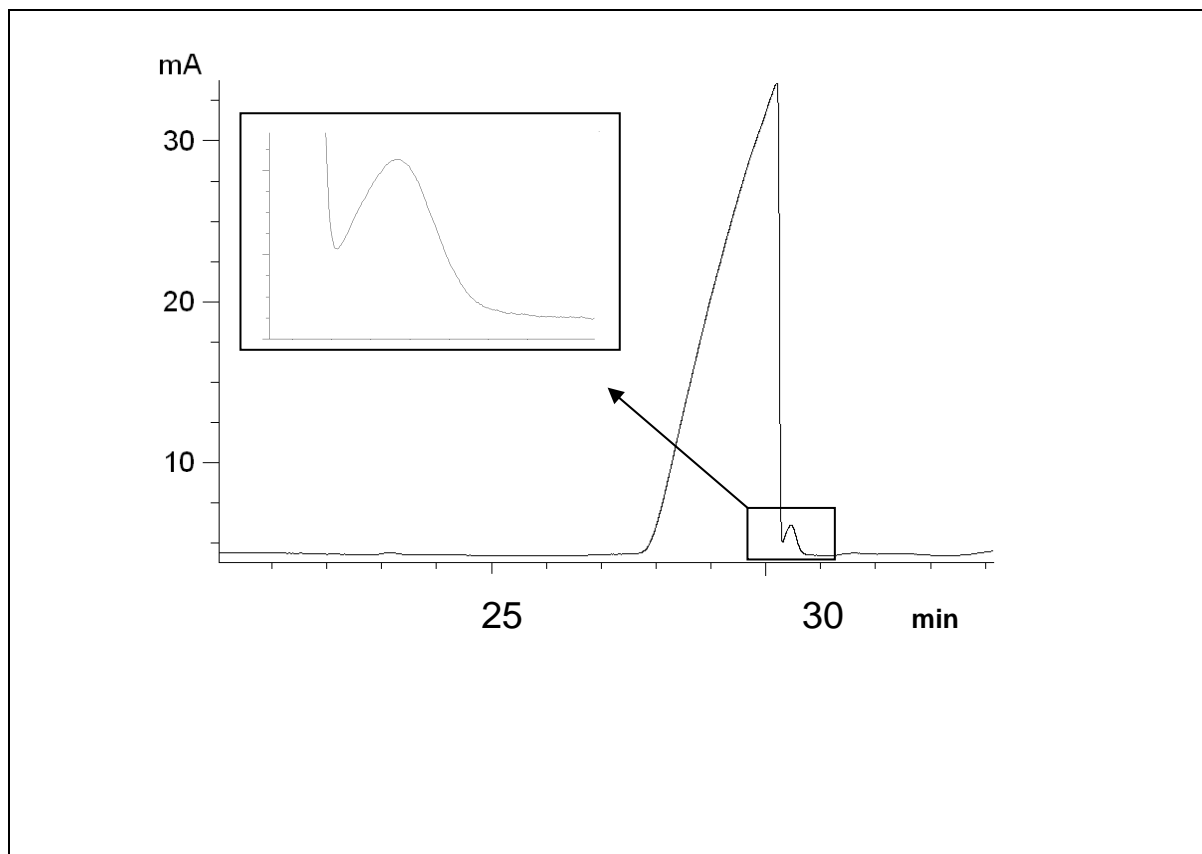


Abbildung 54: 4 mg/ml (+)-Atenolol; Methodenparameter wie zu Abbildung 51 beschrieben

Der nächste Optimierungsschritt beinhaltete eine Masse-Überladung durch Erhöhung des Probenvolumens, indem die Injektionszeit erhöht wurde: von 18 Sekunden über 30 Sekunden bis hin zu 54 Sekunden bei einer definierten Konzentration der Probe von 3,0 mg/ml Atenolol. Die dazugehörigen Elektropherogramme zeigten ab dem ersten Lauf (Injektionszeit: 30 Sekunden) Peaküberlagerungen zwischen dem Hauptbestandteil und der enantiomeren Verunreinigung. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass lange Injektionszeiten keine besseren Trennresultate hervorbringen.

6.4.2 Berechnung der gemessenen und der erforderlichen Auflösung

Die Verwendung von enantiomerenreinen Substanzen, zur Entwicklung von chiralen Trennmethode ist sehr teuer und oft können die reinen Isomere nicht in ausreichend großer Menge in genügend reiner Form bezogen werden (6.1.4). Hingegen sind die racemischen Gemische der chiralen Verbindungen häufig leicht verfügbar. Ein Ziel dieser Arbeit war es eine Strategie zur Methodenentwicklung zu definieren, bei der die racemischen Gemische verwendet werden können, um den Umfang der teuren Entwicklungsschritte mit den schwer beschaffbaren reinen Isomeren zu reduzieren (6.1.4). Eine hohe Auflösung (R_s) der aufgetrennten Enantiomere als racemisches Gemisch (Verhältnis Eutomer zu Distomer 1:1) ist die Voraussetzung für eine Basislinientrennung bei der anzuwendenden Masse-Überladung der Hauptkomponente im Rahmen der Untersuchungen zur Bestimmung der enantiomeren Verunreinigung (6.4.1). Die Auflösung zwischen den Peaks der Hauptkomponente und der enantiomeren Verunreinigung wurde für die vier untersuchten Arzneistoffpaare berechnet und sind in Tabelle 24 dargestellt. Obwohl einige Werte für die Auflösung unterhalb des geforderten Grenzwertes ($> 1,4$) liegen, konnten reproduzierbar Basislinientrennungen erhalten werden (Abbildung 53). Dieses Phänomen lässt sich durch das starke Fronting des Peaks der Hauptkomponente infolge der Masse-Überladung begründen. Die Berechnungsformel der Auflösung gemäß USP [142] legt symmetrische Peakformen zu Grunde. Diese sind in real aufgenommen Chromatogrammen und Elektropherogrammen nur näherungsweise zu finden [143]. Das beschriebene Fronting verursacht eine deutliche Peakassymmetrie, so dass die errechneten Werte zur Auflösung nur als relative Vergleichsdaten herangezogen werden können.

Um Basislinientrennungen trotz der Peaküberladung im Rahmen dieses Abschnitts der Methodenentwicklung zu erhalten, ist ein Wert zwischen drei und vier für die Auflösung der getrennten Enantiomeren-Peaks aus dem racemischen Gemisch bereits zufriedenstellend. Wenn bei den Bestimmungen mittels Peaküberladung die erhaltenen Werte für die Auflösung höher als die theoretische Minimalanforderung waren, ist die im Folgenden beschriebene Vorgehensweise zur Berechnung der erforderlichen Auflösung angewendet worden (Abbildung 55).

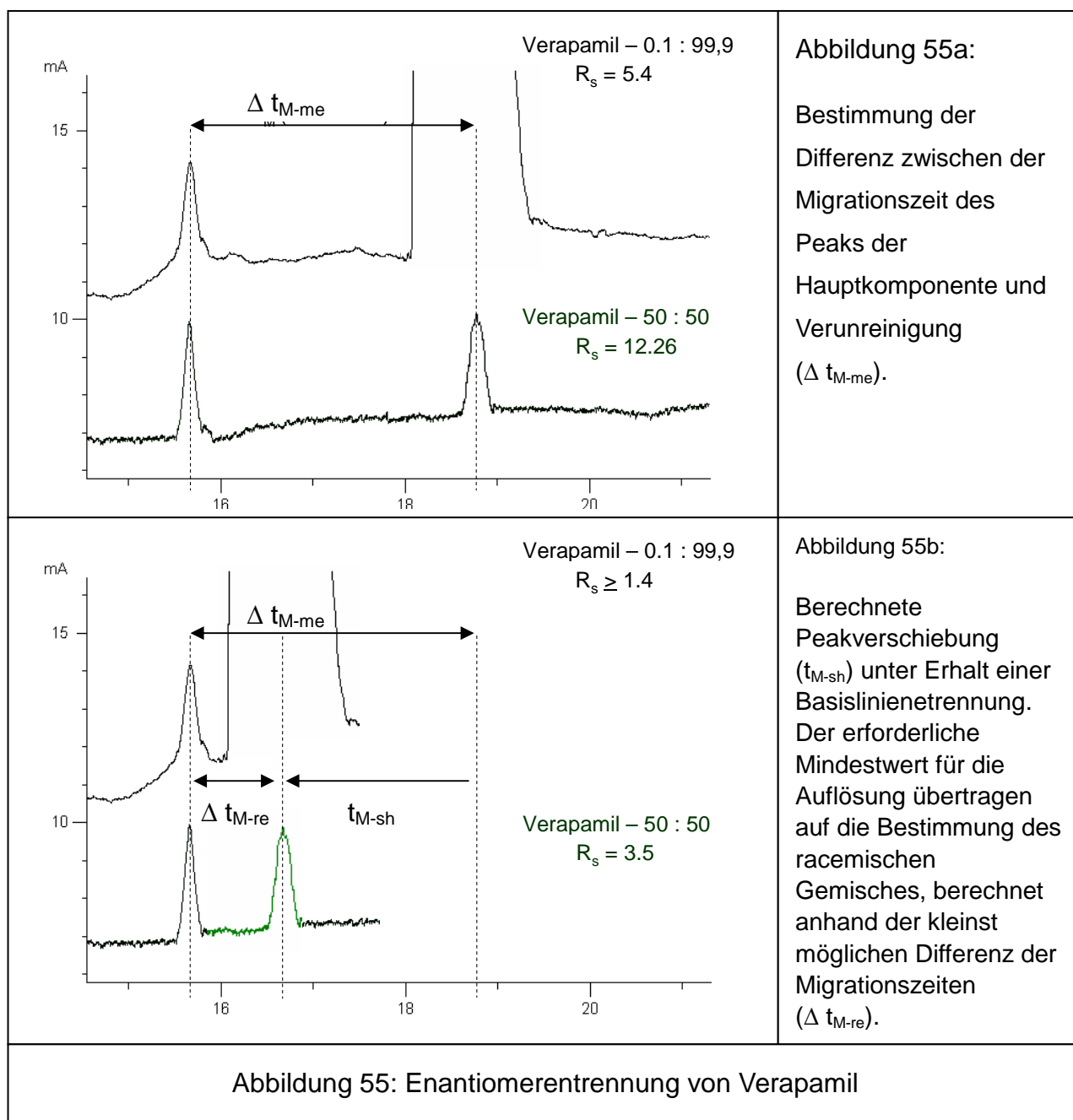


Abbildung 55: Enantiomerentrennung von Verapamil

Zunächst wird die Differenz der Migrationszeiten der Hauptkomponente und der Verunreinigung, Δt_{M-me} , bestimmt (Abbildung 55a). Davon wird die Peakverschiebung der Hauptkomponente, t_{M-sh} , subtrahiert, die ohne den Verlust einer Basislinienentrennung möglich ist. Daraus resultiert die Differenz der Migrationszeiten, Δt_{M-re} , zwischen den Peaks des Enantiomerenpaares als racemisches Gemisch (Abbildung 55b). Aus der so erhaltenen Zeitdifferenz lässt sich die erforderliche

6 Bestimmung der enantiomeren Verunreinigungen

Abbildung 56a. Atenolol

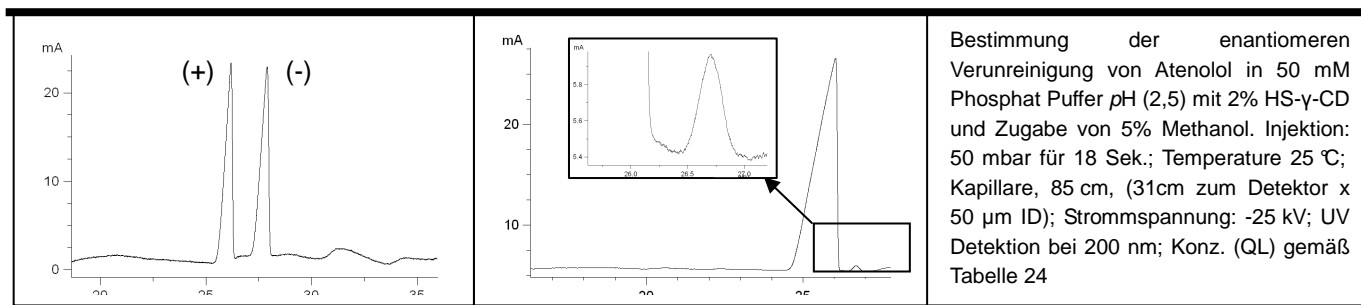


Abbildung 56b. Verapamil

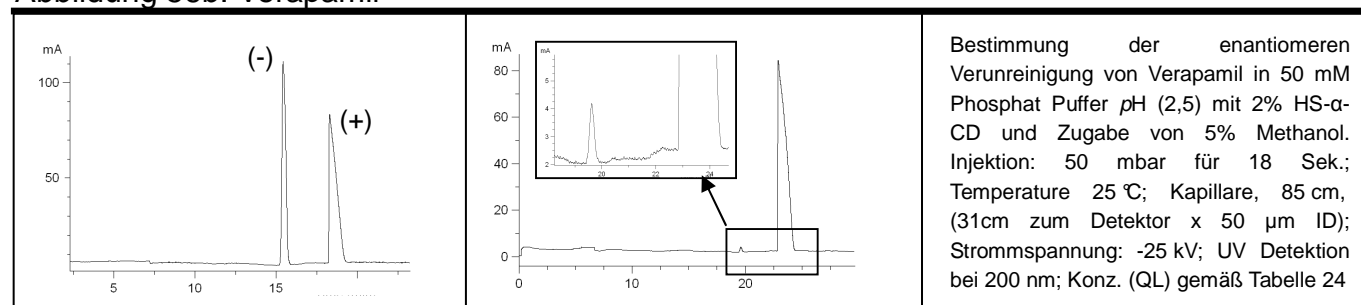


Abbildung 56c. Isoprenalin

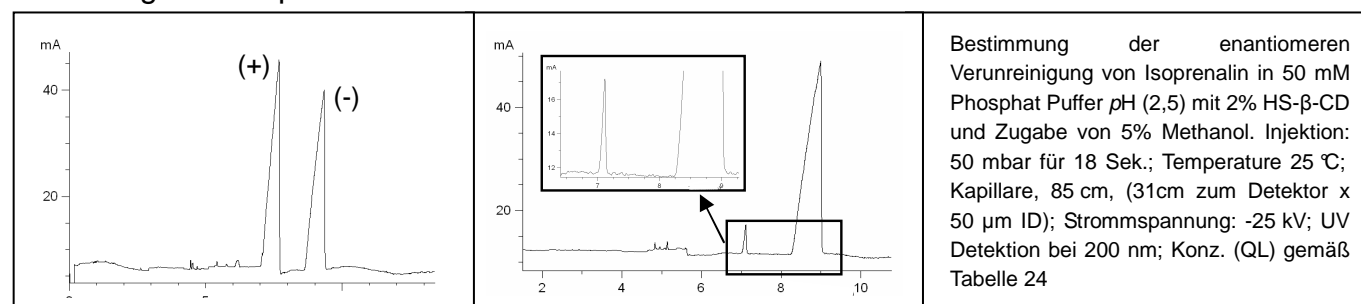


Abbildung 56d. Mandelsäure

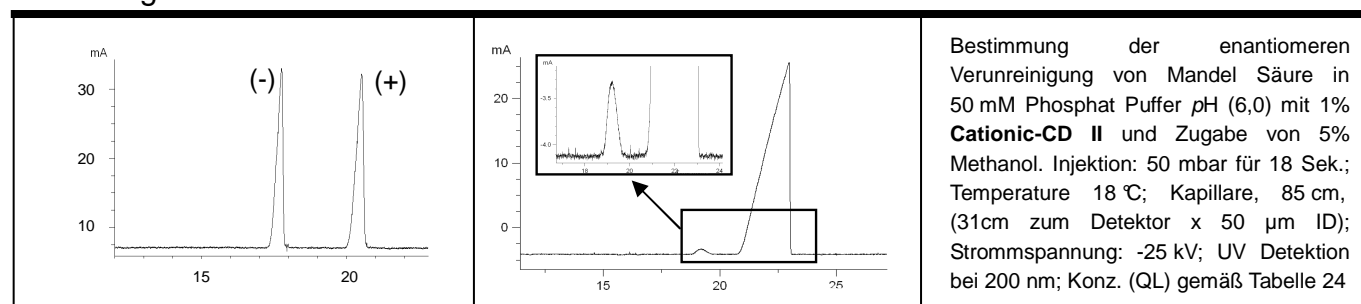


Abbildung 56: Ergebnisübersicht zur Enantiomerentrennung

Auflösung der initialen Trennung des racemischen Gemisches bestimmen ($R_s = 3,5$ für Verapamil). Der erforderliche Auflösung, berechnet auf Grundlage der Daten für Isoprenalin und Mandelsäure (Abbildung 56), ergab $R_s = 4,1$ (Isoprenalin) und $R_s = 3,9$ (Mandelsäure).

6.4.3 Berechnung der Bestimmungsgrenze (QL)

Die Grenzen für die Bestimmungen der enantiomeren Verunreinigungen erfolgten auf indirekte Weise, da die Enantiomere nicht in 100,0 % reiner Form zu erhalten sind. Beispiel Atenolol: (+)-Atenolol ist das Hauptenantomer, mit einer spezifizierten Gesamtkonzentration an Verunreinigung von weniger als 1 %. Aus dem Peakflächenverhältnis wurde ein Gehalt von 0,8 % (-)-Atenolol als enantiomere Verunreinigung ermittelt.

Die folgenden Betrachtungen basieren auf den Vorgaben durch die ICH-Guideline Q2 (R1) [122]: Signal/Rausch-Verhältnis von 10 für die Bestimmungsgrenze (QL) und von 3 für die Nachweisgrenze (DL). Gemessen wurde bei einer Konzentration von 2,0 mg/ml (+)-Atenolol (= 100 % Eutomer). Diese Konzentration wurde gewählt, da hiermit die geforderte Basislinientrennung mit reproduzierbaren Ergebnissen für die korrigierte Peakfläche (R_{P-corr} ; $n = 20$; $RSD\% = 1,3$) erzielt wurde. Im Vergleich dazu war 0,20 mg/ml die geringste Konzentration von (+) Atenolol bei welcher (-)-Atenolol noch mit einer guten Reproduzierbarkeit quantifiziert werden konnte. Bei einem Gehalt von 0,8 % entspricht das einer Konzentration von 1,6 µg/ml (-)-Atenolol. Diese Konzentration stellt somit die Bestimmungsgrenze dar. Entscheidender als die absoluten Konzentrationsangaben ist bei der Betrachtung der enantiomeren Verunreinigung das Verhältnis der Werte zueinander (QL%).

Eingesetzt in Gleichung 17 ergibt sich für die Bestimmungsgrenze in Prozent für Atenolol ein Wert von 0,08%; bei QL (-)-Atenolol = 1,6 µg / ml und C_{max} (+)-Atenolol = 2,0 mg / ml. Die Nachweisgrenze ($S/N > 3$; Abbildung 57) konnte mit einem Wert von 0,5 µg / ml bestimmt werden.

$$QL\% = \frac{QL}{C_{max}} \cdot 100$$

Gleichung 17

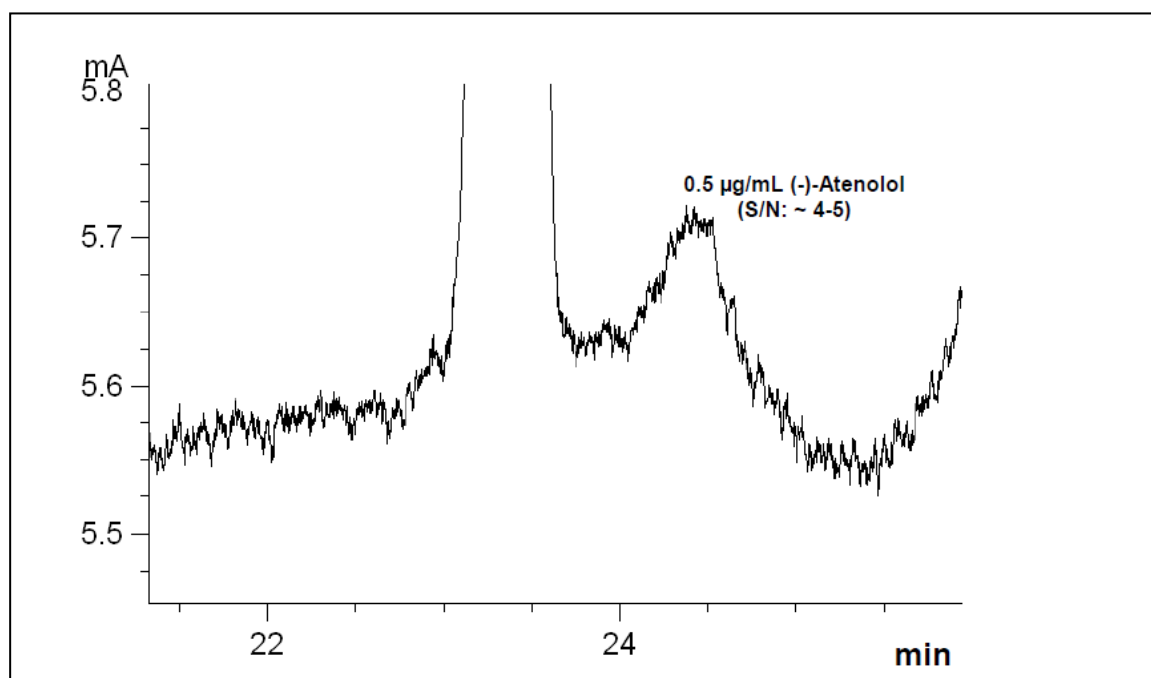


Abbildung 57: DL-Atenolol; Methodenparameter wie zu Abbildung 51 beschrieben

In der Ergebnisübersicht zur Enantiomerentrennung (Abbildung 56) werden jeweils die Trennungen der Racemate dargestellt, sowie die Bestimmung der enantiomeren Verunreinigung. Der Peak der Verunreinigung im jeweiligen zweiten Elektropherogramm (Abbildung 56a bis d) entspricht der spezifischen Bestimmungsgrenze jedes Distomers (Tabelle 24: QL% (ii)). Die QL% der beiden anderen basischen Enantiomerenpaare (Verapamil und Isoprenalin) wurden ebenso nach Gleichung 17 berechnet. Die Werte der relativen Standardabweichungen für die Peakflächen für Atenolol und Isoprenalin deuten auf weitaus niedrigere Bestimmungsgrenzen hin (Tabelle 24), da aber die Anforderungen aus den Vorgaben der ICH-Guideline Q6A [125] in allen Fällen voll erfüllt sind, ist durch weitere Optimierungsschritte von keiner weiteren Leistungsverbesserung der Methoden auszugehen.

Der Wert für die QL% für Mandelsäure konnte, ohne einen weiteren Verdünnungsschritt, direkt bestimmt werden, weil die Reinheit des einzelnen Isomers mit dem erhaltenen Wert für die QL% = 0,1 % übereinstimmt (Tabelle 24). Die QL% der Mandelsäure wurde berechnet, wie es für die anderen Stoffe beschrieben wurde.

6 Bestimmung der enantiomeren Verunreinigungen

Tabelle 24			Übersicht der Ergebnisse zu den vier untersuchten Arzneistoffen							
Konz. [mg/ml]		R _s	t _M [RSD%]		Peakflächen [%] [RSD%]		Peakflächen Verhältnis		DL (i)	
							R _{P-abs} [RSD%]	R _{P-corr} [RSD%]	QL% (ii) (bzgl. C _{max})	
Atenolol			+	-	+	-	n = 20; 2 % of HS-γ-CD		(i) 0,50 µg/ml	
0,20		1,7	4,46	4,67	0,07	4,46	4,33	3,91	(ii) < 0,1 % ***	
0,80		0,8	2,15	2,08	0,05	3,73	3,90	3,37	n.a.	
2,00 (C _{max})		0,5	3,01	3,18	0,05	1,48	1,53	1,26	n.a.	
Verapamil			-	+	-	+	n = 20; 2 % of HS-α-CD		(i) 0,10µg/ml	
0,001 [*]		> 15	1,25	1,83	5,37	5,37	9,88	9,72	(ii) 0,05 %***	
0,50		6	1,75	0,75	4,34	0,02	4,25	4,02	n.a.	
1,00 (C _{max})		3,2	0,11	0,08	2,27	0,05	2,37	2,31	n.a.	
Isoprenalin			+	-	+	-	n = 20; 2 % of HS-β-CD		(i) 0,010 µg/ml	
0,025		> 11	0,15	0,15	5,39	0,11	5,41	5,41	(ii) < 0,05 %***	
0,125		> 8,2	0,46	0,55	2,67	0,09	2,83	2,86	n.a.	
0,50		4,7	0,92	1,11	1,21	0,05	1,23	1,26	n.a.	
1,00 (C _{max})		3,5	2,19	2,06	1,11	0,05	1,15	1,14	n.a.	
Mandelsäure			-	+	-	+	n = 20; 1 % of cationic-CD II		(i) 0,50 µg/ml	
0,001 [*]		10,0	8,0	9,9	5,4	5,6	12,4	11,8	(ii) 0,1 %****	
0,050 [*]		6,2	5,9	6,8	0,70	0,69	0,94	1,5	n.a.	
0,500 ^{**}		2,8	2,0	2,4	2,8	0,05	2,9	2,8	n.a.	
1,00 (C _{max})		3,0	3,4	3,7	5,4	0,05	5,2	5,0	n.a.	

* = Racemat

*** = Berechnung gemäß Gleichung 17

** = 1,0 % Verunreinigung

**** = Messung innerhalb eines Laufes (6.4.3)

6.4.4 Präzisionsdaten

Die Präzision wurde ermittelt, indem die Reproduzierbarkeit bei drei Konzentrationsleveln des Hauptbestandteils, bei gleichbleibender Konzentration der Verunreinigung (QL) bewertet wurde. Für Atenolol zum Beispiel wurde eine Präzision ermittelt, indem die Reproduzierbarkeit bei den Konzentrationsleveln 2,0 mg/ml; 0,8 mg/ml und 0,2 mg/ml (+)-Atenolol neben einer Verunreinigung von 0,8 % (-)-Atenolol gemessen und bewertet wurde (Tabelle 24). Die Reproduzierbarkeit wurde für jedes absolute und korrigierte Peakflächenverhältnis mit einem Stichprobenumfang $n = 20$ bestimmt. Die Ergebnisse für die Reproduzierbarkeit der Peakflächenverhältnisse und die QL%-Berechnungen für die vier getesteten Wirkstoffe (Atenolol, Isoprenalin, Verapamil und Mandelsäure) wurden in Tabelle 24 zusammengefasst. Die Elektropherogramme sind in Abbildung 56 zu sehen.

6.4.5 Zusammenfassung

Im ersten Schritt ist die Trennung der Enantiomere durch Anwendung einer ausgereiften Screening-Strategie erreicht worden. Bei einem pH-Wert von 2,5 wurden die basischen Substanzen in die ionische Form überführt. Die dadurch positiv geladenen Moleküle zeigen deutlich stärkere Wechselwirkungen mit den Cyclodextrinen, vor allem zu negativ geladenen CDs. Die Untersuchungen haben gezeigt, dass für nahezu alle basischen Substanzen eine initiale Trennung der Enantiomerenpaare durch die Verwendung von negativ geladenen Cyclodextrinen bei umgekehrter Polarität erreicht werden konnte.

Zur Trennung von sauren Enantiomerenpaaren werden neutrale oder positiv geladene Cyclodextrine eingesetzt. Schon während der ersten Läufe des Screenings der aziden Substanzpaare wurde deutlich, dass nur bei Verwendung der positiv geladene Selektoren erfolgreiche Trennungen erhalten werden konnten. Deshalb wurde die Auswahl der chiralen Selektoren auf die quartären Ammoniumverbindungen gelöst in 50 mM Phosphatpuffer pH 6,0 fokussiert. Die Anlagerung der positiv geladenen CDs an der Kapillarwand konnte durch Wahl

kleiner Konzentrationen fast gänzlich ausgeschlossen werden. Darüber hinaus konnten durch eine angepasste Spülprozedur stabile Trennungen innerhalb von längeren Messserien ($n = 20$) reproduziert werden. Nach Abschluss des erfolgreichen Screenings konnten die initial erhaltenen Trennungen weiter verbessert werden. Neben dem pH -Wert der Pufferlösung und der CD-Konzentration (1 bis 5 %) zeigte vor allem der Zusatz von organischem Lösungsmittel (Methanol) ausgeprägte Effekte auf die Trennung der Substanzpaare. Nach Optimierung im Rahmen der Untersuchung der racemischen Gemische konnten die Methodenbedingungen basierend auf den erhaltenen Ergebnissen zur Bestimmung der enantiomeren Verunreinigung definiert werden.

Das Erfüllen der Anforderungen gemäß den Vorgaben der ICH-Guideline Q6A [125] unterstreicht die Verwendbarkeit der erarbeiteten Entwicklungsstrategie. Ein Ergebnis dieser Arbeit ist die Definition des erforderlichen Wertes für die Auflösung (R_s), um eine Bestimmungsgrenze (QL) unter 0,1 % für die Konzentration der enantiomeren Verunreinigung zu erreichen. Der Wert für die Auflösung bei Trennung des racemischen Gemisches liegt zwischen drei und vier. Erfüllt man diese Anforderung kann trotz der erforderlichen Peaküberladung der Hauptkomponente eine Basislinientrennung zur Bestimmung der enantiomeren Verunreinigung erreicht werden. Die beschriebene Strategie konnte mit allen untersuchten Substanzen nachvollzogen und QL-Werte unter 0,1 % bestimmt werden. Der Start der Methodenentwicklung mit dem racemischen Gemisch hat den entscheidenden Vorteil, dass die Untersuchung der Enantiomerenpaare deutlich weniger kostenintensiv ist und diese dazu weitaus häufiger in definiert hoher Qualität verfügbar sind.

7 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit gliedert sich in drei Teile. Davon behandeln zwei Abschnitte Aspekte der Methodenentwicklung und -anwendung in der MEKC. Im dritten wird die Bestimmung von enantiomeren Verunreinigungen mittels Kapillarelektrophorese bei Verwendung von chiralen Selektoren (Cyclodextrinen) beschrieben. Neben der Entwicklung und Validierung von CE-Methoden anhand praktischer Anwendungsbeispiele, wie die Auftrennung der Bestandteile eines Erkältungssaftes, konnten allgemein gültige Strategien in der Anwendung und Entwicklung von Bestimmungsmethoden in der CE erarbeitet werden.

In Kapitel 4 werden die Faktoren (wie z. B. Temperaturschwankungen oder Viskositätsunterschiede der Lösungen (Tabelle 9)) beschrieben, die Einflüsse auf die Leistungsparameter von kapillarelektrophoretischen Methoden besitzen, und wie diese durch die Verwendung von Internen Standardsubstanzen kompensiert werden können. Die Darstellung der allgemeinen Voraussetzungen und der speziellen Anforderungen zur Verwendung von Standards in der MEKC unterstützt bei der Auswahl geeigneter Substanzen. In Tabelle 13 sind die Ergebnisse der Substanzuntersuchungen von 22 IS-Substanzen unter Angabe des Kapazitätsfaktors (k_s -Wert), der Migrationszeit (t_R) und der relativen Migrationszeit ($t_R - t_0$) zusammen gestellt. In Verbindung mit der Strukturformel und den Absorptionsmaxima (UV-Spektren: Anhang 3) ist die Tabelle ein Arbeitsmittel für die schnelle Auswahl eines geeigneten Internen Standards in der Entwicklung quantitativer MEKC - Bestimmungen. Durch die Bestimmung von IS8 (Gemisch aus 8 Standardsubstanzen) konnte die Reproduzierbarkeit und die zu erwartende Präzision bei Verwendung dieser Substanzen ermittelt werden (Tabelle 14; Intermediate Precision RSD% = 0,8 bis 1,2). Die Vorteile für zukünftige Methodenentwicklungen durch die Verwendung von Internen Standardsubstanzen konnte in verschiedenen Anwendungsbeispielen für die untersuchte Substanzauswahl bewiesen werden.

Ausführlich diskutiert wurde dabei die Trennung der Inhaltsstoffe eines Erkältungssaftes. Die selektive Bestimmung von Inhaltsstoffen eingebettet in einer Hilfsstoffmatrix stellte dabei eine besondere Herausforderung dar. Separate und zeitaufwendige Methoden zur Bestimmung der Wirkstoffe, Doxylamin, Ephedrin,

Dextromethorphan und Paracetamol per HPLC konnten erfolgreich durch eine leistungsstarke MEKC-Methode abgelöst werden. Die MEKC besitzt durch ihr Zusammenspiel aus elektrophoretischen und chromatographischen Mechanismen eine hohe Trennleistung und Selektivität. Sie konnte für die Auftrennung der Inhaltsstoffe in Gegenwart einer komplexen Matrix ohne aufwendige Probenaufbereitung weiterentwickelt werden. Die wichtigsten Parameter, die im Laufe der Entwicklungsphase optimiert worden sind, waren der Puffertyp, der pH -Wert und die SDS-Konzentration. Die Optimierung der Pufferlösung führte zu einer selektiven und reproduzierbaren Trennung. Die Einführung einer IS-Substanz verbesserte zusätzlich das Ergebnis im Hinblick auf die Präzision, so dass RSD%-Werte für die Peakflächen zwischen 1,0 % für die Hauptkomponente (Paracetamol) und 2,0 % für niedriger konzentrierte Analyten erreicht wurden.

Die Bestimmung der enantiomeren Verunreinigung basierte auf der Weiterentwicklung literaturbekannter Screening-Strategien. Die Untersuchungen haben gezeigt, dass für nahezu alle basischen Substanzen eine initiale Trennung der Enantiomerenpaare durch die Verwendung von negativ geladenen Cyclodextrinen im Reversed-Polarity-Modus erreicht werden konnte. Erfolgreiche Trennungen der aziden Substanzpaare konnten nur bei Verwendung der positiv geladene Selektoren erhalten werden. Nach Abschluss des erfolgreichen Screenings konnten die initial erhaltenen Trennungen weiter verbessert werden. Neben dem pH -Wert der Pufferlösung und der CD-Konzentration (1 bis 5 %) zeigte vor allem der Zusatz von organischem Lösungsmittel (Methanol) ausgeprägte Effekte auf die Trennung der Substanzpaare. Nach Optimierung im Rahmen der Untersuchung der racemischen Gemische konnten die Methodenbedingungen basierend auf den erhaltenen Ergebnissen zur Bestimmung der enantiomeren Verunreinigung definiert werden.

Ein Ergebnis dieser Arbeit ist die Ermittlung des erforderlichen Wertes für die Auflösung (R_s), um eine Bestimmungsgrenze (QL) unter 0,1 % für die Konzentration der enantiomeren Verunreinigung erreichen zu können. Dieser Wert soll zwischen drei und vier liegen, wenn er mit einem racemischen Gemisch ermittelt wird. Erfüllt man diese Anforderung kann trotz der erforderlichen Peaküberladung der Hauptkomponente eine Basislinientrennung zur Bestimmung der enantiomeren Verunreinigung erreicht werden. Die beschriebene Strategie konnte mit allen

untersuchten Substanzen nachvollzogen und QL-Werte unter 0,1 % erhalten werden. Der Vorteil liegt darin, dass racemische Gemische der zu untersuchenden Enantiomerenpaare, wesentlich günstiger sind und leichter in definierter Qualität verfügbar sind.

Die erarbeitete Methodenentwicklungsstrategie zur Bestimmung enantiomerer Verunreinigungen wurde anhand der Untersuchungen von Atenolol, Verapamil, Isoprenalin und Mandelsäure in der Praxis angewendet.

8 Experimenteller Teil

8.1 Instrumentierung

8.1.1 Kapillarelektrophoresegeräte

Die praktischen Arbeiten wurden auf verschiedenen CE-Geräten durchgeführt.

Die Untersuchungen zur Verwendung von Internen Standards in der MEKC (4) wurden auf einem Crystal CE 310 System von Unicam (UniCam Ltd., Cambridge, UK) durchgeführt. Die Detektion erfolgte mit einem Spectra Physics 100 UV Detektor (Wellenlänge 210 nm) bei einer Temperatur von 25°C und einer angelegten Spannung von + 20 kV.

Die Trennung der Inhaltsstoffe des Erkältungssaftes Wick MediNait™(0) wurde im Rahmen des Wahlpflichtfachs (WS 04/05) auf dem Kapillarelektrophoresegerät SpectraPhoresis 1000 (Thermo Finnigan) begonnen und auf dem oben beschriebenen Crystal System fortgesetzt. Die ersten Schritte der Methodenentwicklung wurden bei 25°C und einer angelegten Spannung von + 30 kV durchgeführt. Die Detektion erfolgte bei 214 nm. Später wurde die Methodenentwicklung auf ein PrinCE 550 CE System (Prince Technologies, Emmen, NL) übertragen und abgeschlossen. Dieses CE-Instrument war mit einem Lambda 1010 UV-Detektor (Bandbreite: 6 nm; Bischoff, Leonberg, D) ausgestattet.

Die Arbeiten zur Bestimmung von Enantiomeren Verunreinigungen erfolgten ebenfalls sowohl auf dem Crystal System von UniCam (6.2. Screening) als auch auf dem PrinCE 550 CE System (6.3 Optimierung und 6.4 Enantiomeren Bestimmung).

Tabelle 25 Kapillarelektrophoresegeräte

Hersteller	Model	Detektor
Thermo Finnigan	SpectralPhoresis 1000	Integrierter UV-Detektor
UniCam Ltd.	Crystal CE 310 System	Spectra Physics 100 UV
PrinCE Technologies	550 CE System	Lambda 1010 UV

8.1.2 UV-Spektrometer

Die Aufnahme der UV-Spektren der Internen Standardsubstanzen und der SDS-Pufferlösungen erfolgte mit einem Specord 200 der Firma Analytik Jena AG.

Tabelle 26 UV-Spektrometer	
Hersteller	Model
Analytik Jena AG	Specord 200

8.1.3 Allgemeine Geräte

Tabelle 27 Allgemeine Geräte		
Gerät	Hersteller	Model
Analysenwaage I	Sartorius	BP 211 D
Analysenwaage II	Sartorius	R 160 P
Feinwaage	Mettler	PC 4400
pH-Meter	Metrohm	620 pH
Kapillarfensterbrenner	Conrad Electronics	Minigaslötbrenner
Pipetten	Eppendorf	Reference / Research (10, 100, 200, 1000 µl)
Ultraschallbad	Bandelin Sonorex	RK 102

8.2 Software

Die für die Gerätesteuerung und zur Auswertung notwendigen Softwarepakete sind in Tabelle 28 zusammengefasst.

Tabelle 28 Software			
Gerät	Aufgabe	Bezeichnung	Version
SpectraPhoresis 1000	Gerätesteuerung/ Datenaufnahme	PC 1000 Software (OS/2 Warp 3.0)	3.0.3
	Auswertung	K.I.S.S	1.00
Crystal CE System	Gerätesteuerung	UICS CE	1.3β
	Datenaufnahme	4880 Data Handling System	1.2
	Auswertung	K.I.S.S	1.00
PrinCE 550 CE-System	Gerätesteuerung	WinPrinCE	8.0
	Datenaufnahme	DAX Data Acquisition	8.0
	Auswertung	DAX Analysis	8.0
Specord 200 (UV)	Datenaufnahme	WinAspect	1.2

8.3 Kapillaren

Bei den experimentellen Arbeiten wurden Kapillaren von Polymicro (Polymicro Technologies LLC, Phoenix, AZ, USA) verwendet (Tabelle 29).

Tabelle 29 Kapillarchargen von Polymicro			
Charge	I.D. [μm]	O.D. [μm]	Typ
GBH 02C	46-50	353	bare fused silica
XFZ 05A	50	360	bare fused silica
APJ 02A	50	360	bare fused silica

Die Konditionierung und Equilibrierung der Kapillaren wurde anhand des folgenden Schemas durchgeführt. Die Aktivierung der Oberfläche der Kapillaren erfolgt durch 60 bis 120-minütiges Ätzen mit Natronlauge (1 Mol/l bei 1200 bis 1500 mbar). Anschließend wird die Lauge durch 30 bis 60-minütiges Spülen mit Wasser aus dem System entfernt. Der Spülschritt wird mit dem Trennpuffer wiederholt. Danach erfolgt die Equilibrierung der Kapillaroberfläche durch Anlegen der Spannung (gemäß Trennbedingungen) für 60 bis 120 Minuten.

8.4 Reagenzien und Chemikalien

Alle verwendeten Reagenzien und Chemikalien weisen Arzneibuchqualität auf und besaßen einen dem jeweiligen Verwendungszweck entsprechenden Reinheitsgrad („*pro analysis*“ oder „*HPLC grade*“).

Wasser für die Herstellung von Puffern und Eluenten wurde durch doppelte Destillation von demineralisiertem Wasser gewonnen.

Tabelle 30 Reagenzien und Chemikalien - allgemein

Reagenz	Hersteller	Art.-Nr.
Borsäure	Merck	1.00165.0500
Essigsäure	Fluka	45740
H ₃ PO ₄ 85 %	Fluka	79621
KH ₂ PO ₄	Riedel-de Haën	31270
Na ₂ B ₄ O ₇ • 10H ₂ O	Fluka	RB11464
NaH ₂ PO ₄ • 2H ₂ O	Fluka	71500
Natriumhydroxid	Sigma-Aldrich	S2770
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Fluka	61715
Methanol	Fisher Scientific	M/4056/17

Tabelle 31 Interne Standard Substanzen

Interner Standard	Synonym	Hersteller	CAS Nr.	Qualität
Paracetamol	<i>N</i> -(4-Hydroxyphenyl)-acetamid	Sigma-Aldrich	103-90-2	> 99,0 %
Resorcin	<i>m</i> -Dihydroxybenzol	Sigma-Aldrich	108-46-3	> 99,0 %
Coffein	1,3,7-Trimethyl-2,6(1 <i>H</i> ,3 <i>H</i>)-purindion	Fluka	58-08-2	puriss.
Phenol	Hydroxybenzen	Sigma-Aldrich	108-95-2	> 99,0 %
Acetanilid	<i>N</i> -Phenylacetamid	Fluka	103-84-4	p.a. ≥ 99,5 %
Glibenclamid	5-chloro- <i>N</i> -[2-[4-(cyclohexylcarbamoylsulfamoyl)-phenyl]ethyl]-2-methoxybenzamid	Sigma-Aldrich	10238-21-8	≥ 99,0 %
Naproxen	(<i>S</i>)-2-(6-Methoxy-2-naphthyl)propionsäure	Fluka	22204-53-1	98,0 %
Cumarin	Chromen-2-on	Sigma	91-64-5	≥ 99,0 %
Phenacetin	<i>N</i> -(4-ethoxyphenyl)-ethanamid	Fluka	62-44-2	≥ 98,0 %
Brenzcatechin	1,2-Dihydroxybenzol	Fluka	120-80-9	≥ 98,0 %
3,5-Dihydroxybenzoesäure	β-Resorcinsäure	Aldrich	99-10-5	97,0 %
4-Hydroxybenzoesäure	para-Hydroxybenzoesäure	Aldrich	99-96-7	99,0 %
Nicotinsäure	3-Pyridincarbonsäure (Vitamin B ₃)	Merck	59-67-6	99,0 % (USP XV)

Interner Standard	Synonym	Hersteller	CAS Nr.	Qualität
Salicylsäure	2-Hydroxybenzen-carbonsäure	Sigma-Aldrich	69-72-7	≥ 99,0 %
p-Hydroxy-benzoesäure-methylester	Methyl-4-hydroxybenzoat	Sigma-Aldrich	99-76-3	≥ 99,0 %
4-Amino-benzoesäure	para-Aminobenzoesäure (PABA)	Fluka	150-13-0	≥ 98.0 %
Benzocain	4-Aminobenzoesäure-ethylester	Sigma-Aldrich	94-09-7	≥ 99,0 %
2-Naphthol	2-Hydroxynaphthalin	Aldrich	135-19-3	99,0 %
Phenylethyl-amin	2-Phenyl-1-aminoethan (PEA)	Fluka	64-04-0	≥ 99,0 %
Trimethoprim	2,4-Diamino-5-(3,4,5-trimethoxybenzyl)-pyrimidin	Sigma	738-70-5	≥ 98.0 %
Neostigmin-bromid	3-(N,N-Dimethylcarbamoyloxy)-N,N,N,-trimethylanilinium bromid	Sigma	114-80-7	≥ 98.0 %
Ephedrin-hydrochlorid	(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i>)-(-)-2-Methylamino-1-phenyl-1-propanol hydrochloride	Fluka	50-98-6	≥ 99,0 %

Tabelle 32 Standards der Inhaltsstoffe des Erkältungssaftes Wick MediNait™

Referenz-standard	Synonym	Hersteller	CAS Nr.	Qualität
Paracetamol	<i>N</i> -(4-Hydroxyphenyl)-acetamid	Sigma-Aldrich	103-90-2	> 99,0 %
Benzocain (IS)	4-Aminobenzoessäure-ethylester	Sigma-Aldrich	94-09-7	≥ 99,0 %
Doxylamin	N,N-Dimethyl- 2-(1-phenyl-1-pyridin- 2-yl-ethoxy)-ethanamin	Sigma	469-21-6	> 98,0 %
Dextromethorphan	(9 <i>S</i> ,13 <i>S</i> ,14 <i>S</i>)-3-Methoxy-17-methylmorphinan	Fluka	125-71-3	Ph. Eur.
Ephedrin-hydrochlorid	(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i>)-(-)-2-Methylamino-1-phenyl-1-propanolhydrochlorid	Fluka	50-98-6	≥ 99,0 %

Tabelle 33 Analyten und Standardsubstanzen zur Enantiomerenbestimmung

Analyten	Synonym	Hersteller	CAS Nr.	Qualität
Analyten als racemische Mischungen				
Atenolol	(±)-[4-[2-Hydroxy-3-(1-methyl-ethylamino)-propoxy]-phenyl]ethanamid	Sigma	29122-68-7	≥ 98,0 %
Alprenolol-hydrochlorid	1-(1-Methylethylamino)-3-(2-prop-2-enylphenoxy)-propan-2-ol-hydrochlorid	Fluka	13707-88-5	≥ 98,0 %
Ephedrin-hydrochlorid	(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i>)-(-)-2-Methylamino-1-phenyl-1-propanol hydrochlorid	Fluka	50-98-6	≥ 99,0 %
Ibuprofen	(<i>RS</i>)-2-[4-(2-Methylpropyl)-phenyl]propionsäure	Sigma	15687-27-1	≥ 99,0 %
Isoprenalin	(<i>RS</i>)-1-(3,4-Dihydroxy-phenyl)-2-isopropyl-aminoethanolhydrochlorid	Aldrich	51-30-9	≥ 98,0 %
Ketoprofen	(<i>RS</i>)-2-(3-Benzoylphenyl)-Propionsäure	Sigma-Aldrich	22071-15-4	≥ 98,0 %
Mandelsäure	Hydroxyphenylelessigsäure	Aldrich	90-64-2	≥ 99,0 %
Methadon-hydrochlorid	(<i>RS</i>)-6-Dimethylamino-4,4-diphenylheptan-3-on-hydrochlorid	Sigma	1095-90-5	≥ 98,0 %
Naproxen	(<i>S</i>)-2-(6-Methoxy-2-naphthyl)propionsäure	Fluka	22204-53-1	98,0 %
Pindolol	1-(1 <i>H</i> -Indol-4-yloxy)-3-(1-methylethylamino)-propan-2-ol	Aldrich	13523-86-9	≥ 98,0 %
Promethazin-hydrochlorid	10-[2-(Dimethylamino)-propyl]-phenothiazin-hydrochlorid	Sigma	58-33-3	≥ 98,0 %

Analyten	Synonym	Hersteller	CAS Nr.	Qualität
Analyten als racemische Mischungen				
Propranolol-hydrochloride	(±)-1-Isopropylamino-3-(1-naphthyloxy)-2-propanol-hydrochlorid	Sigma	318-98-9	≥ 98,0 %
Tryptophan	(RS)-2-Amino-3-(1H-indol-3-yl)-propansäure (TRP)	Aldrich	54-12-6	≥ 99,0 %
Verapamil-hydrochlorid	5-((3,4-Dimethoxy-phenethyl)-methylamino)-2-(3,4-dimethoxy-phenyl)-2-isopropylvaleronitril-hydrochlorid	Aldrich	152-11-4	98,0 %
Analyten als enantiomerenreine Substanzen				
(R)-(+)-Atenolol	(+)-[4-[2-Hydroxy-3-(1-methyl-ethylamino)-propoxy]-phenyl]ethanamid	Aldrich	56715-13-0	99,0 %
(S)-(-)-Atenolol	(-)-[4-[2-Hydroxy-3-(1-methyl-ethylamino)-propoxy]-phenyl]ethanamid	Aldrich	93379-54-5	99,0 %
(-)-Isoprenalin-hydrochlorid	(R)-1-(3,4-Dihydroxy-phenyl)-2-isopropyl-aminoethanolhydrochlorid	Sigma	5984-95-2	≥ 98,0 %
(R)-(-)-Mandelsäure	(R)-α-Hydroxyphenylelessigsäure	Aldrich	611-71-2	≥ 99,0 %
(S)-(+)-Mandelsäure	(S)-α-Hydroxyphenylelessigsäure	Aldrich	17199-29-0	≥ 99,0 %
S(-)-Verapamil-hydrochlorid	(S)-5-((3,4-Dimethoxy-phenethyl)-methylamino)-2-(3,4-dimethoxy-phenyl)-2-isopropylvaleronitril-hydrochlorid	Sigma	36622-28-3	≥ 98,0 %

Tabelle 34 Cyclodextrine als chirale Selektoren				
CDs	Abk.	Hersteller	CAS Nr.	Qualität
Neutrale Cyclodextrine				
α -Cyclodextrin	α -CD	Sigma-Aldrich	10016-20-3	> 98,0 %
β -Cyclodextrin	β -CD	Sigma-Aldrich	7585-39-9	\geq 98,0 %
γ -Cyclodextrin	γ -CD	Sigma-Aldrich	17465-86-0	> 99,0 %
Hydroxypropyl- α -Cyclodextrin	HP- α -CD	Sigma-Aldrich	128446-33-3	nicht spezifiziert
Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin	HP- β -CD	Sigma-Aldrich	128446-35-5	nicht spezifiziert
Hydroxypropyl- γ -Cyclodextrin	HP- γ -CD	Sigma-Aldrich	128446-34-4	nicht spezifiziert
Succinyl- β -Cyclodextrin	Succ- β -CD	Sigma-Aldrich	keine Angabe	\sim 95,0 %
Geladene Cyclodextrine				
Carboxymethyl- β -Cyclodextrin	CM- β -CD	Sigma-Aldrich	keine Angabe	nicht spezifiziert
Hochsulfatiertes α -Cyclodextrin	HS- α -CD	Beckman-Coulter	keine Angabe	20 % (w/v) in Wasser gelöst
Hochsulfatiertes β -Cyclodextrin	HS- β -CD	Beckman-Coulter	keine Angabe	20 % (w/v) in Wasser gelöst
Hochsulfatiertes β -Cyclodextrin	HS- β -CD	Supelco	keine Angabe	nicht spezifiziert

CDs	Abk.	Hersteller	CAS Nr.	Qualität
Geladene Cyclodextrine				
Hochsulfatiertes γ -Cyclodextrin	HS- γ -CD	Beckman-Coulter	keine Angabe	20 % (w/v) in Wasser gelöst
Quatäres β -Cyclodextrin	QA-CD I	Sigma-Aldrich	keine Angabe	nicht spezifiziert
6-Monodeoxy-6-monoamino- β -Cyclodextrin	QA-CD II	Sigma	keine Angabe	nicht spezifiziert
Phosphatiertes α -Cyclodextrin	Phos- α -CD	Sigma-Aldrich	699020-02-5	purum
Phosphatiertes γ -Cyclodextrin	Phos- γ -CD	Sigma-Aldrich	199684-62-3	purum

8.5 Lösungen und Puffer

Für die Herstellung aller Lösungen wurde bidestilliertes Wasser verwendet. Alle Lösungen wurden vor Gebrauch durch Rotilabo®-Filter (CME, 220 μ m; Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe) gegeben und im Ultraschallbad entgast.

8.5.1 Lösungen und Puffer für IS-Experimente (4)

Alle Lösungen die zu Untersuchungen von Internen Standardsubstanzen in der MEKC verwendet wurden, sind täglich frisch hergestellt worden. Die pH-Werte der verwendeten Pufferlösungen sind nach der Herstellung kontrolliert und gegebenenfalls justiert worden.

8.5.1.1 Borat-Puffer 50 mM (pH 8,5)

Für die Herstellung des Borat-Puffers 50mM (pH 8,5) werden 3,092 g Borsäure in 100 ml bidestilliertem Wasser gelöst. Der pH-Wert der Pufferlösung wird mit einer frisch hergestellten Natriumhydroxid-Lösung (1 mol/l) auf den pH-Wert von 8,5 eingestellt. Danach wird die hergestellte Stammlösung auf 1000,0 ml aufgefüllt.

8.5.1.2 Borat-Puffer 50 mM (pH 8,5) mit MeOH-Zusatz (3,95 g / 100ml)

5,0 ml MeOH werden schrittweise mit Borat-Puffer (8.5.1.1) zu 100,0 ml aufgefüllt. Nach jeder Teilvolumenzugabe wird die Lösung durchgemischt, um Abweichungen durch Volumenkontraktionen auszuschließen. Die methanolhaltige Pufferlösung wird zur Herstellung der Probelösungen (8.5.1.4) verwendet und dient als Stammlösung für den Trennpuffer (8.5.1.3).

8.5.1.3 Borat-Puffer mit SDS Zusatz (50 mM)

Um die SDS-Borat-Puffer Lösung herzustellen werden zu 50 ml des methanolhaltigen Boratpuffers (8.5.1.2) 1.442 g Natriumdodecylsulfat gegeben und die Lösung bis zu einem Volumen von 100,0 ml mit methanolhaltigen Puffer (8.5.1.2) aufgefüllt. Die hergestellte Pufferlösung enthält 50 mM SDS.

8.5.1.4 Probenlösungen

Die Probenlösungen werden mit dem methanolhaltigen Borat-Puffer (8.5.1.2) hergestellt. Jeweils 50 bis 100 mg der Probensubstanz werden in 25,0 ml der Pufferlösung gelöst, so dass daraus eine Probenkonzentration zwischen 2 bis 4 mg resultiert (Tabelle 13).

8.5.2 Lösungen und Puffer für die MEKC-Experimente zur Trennung der Inhaltsstoffe im Erkältungssaft

8.5.2.1 Borat-Puffer 10 mM (pH 10; 7,5 % MeOH, 150 mM SDS)

Die Herstellung der Pufferlösung erfolgt in vier Herstellungsschritten:

- (i) 95,34 mg Borsäure werden in 7,50 ml MeOH in einem 100 ml Messkolben gelöst.
- (ii) 4,326 g SDS werden in 80 ml bidestilliertem Wasser unter zur Hilfenahme eines Magnetrührers komplett gelöst (5 bis 10 Minuten).
- (iii) Die SDS-Stammlösung (ii) wird in den 100 ml Messkolben (i) überführt und der Messkolben wird mit bidestilliertem Wasser bis zur Markierung aufgefüllt.
- (iv) Der pH -Wert der Pufferlösung wird mit einer frisch hergestellten Natriumhydroxid-Lösung (1 mol/l) auf den pH -Wert von 10,0 eingestellt. Die frisch hergestellte Pufferlösung wird in 4,0 ml Puffer-Vials abgefüllt und die Vials zum Schutz des Puffers luftdicht verschlossen (Abbildung 39).

8.5.2.2 Probenlösungen

Zur Herstellung der Probenlösung werden 2,50 ml des Erkältungssaftes mit bidestilliertem Wasser zu 10,0 ml verdünnt (1:4 Verdünnung). Nach diesem Verdünnungsschritt wird der Probenlösung 80,0 mg Benzocain als Interner Standard zugegeben und im Ultraschallbad vollständig gelöst.

8.5.2.3 Referenzlösungen

Die Referenzlösungen der einzelnen Inhaltsstoffe des Erkältungssaftes werden als wässrige Lösungen hergestellt entsprechend den Konzentrationen wie sie in der Fertigarzneimittelformulierung vorliegen. Zur Identifizierung der Peaks wurden 1,50 ml dieser Lösungen zu der Probenlösung (8.5.2.2) gegeben.

8.5.3 Lösungen und Puffer für die Bestimmung der enantiomeren Verunreinigungen

8.5.3.1 Pufferlösungen

Für die Herstellung des Phosphatpuffers (pH 2,5; 50 mM) werden 6,980 g Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat in 1000,0 ml bidestilliertem Wasser gelöst und mit Perchlorsäure (0,1 Mol/l) auf einen pH-Wert von 2,5 eingestellt.

Für die Herstellung des Phosphatpuffers (pH 6,0; 50 mM) werden ebenfalls 6,980 g Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat in 1000,0 ml bidestilliertem Wasser gelöst, aber mit Natriumhydroxid Lösung (1,0 Mol/l) auf einen pH-Wert von 6,0 eingestellt.

Während einzelner Optimierungsschritte wurden Pufferlösungen mit Perchlorsäure (0,1 Mol/l) auch auf pH 3,0 und 3,5 eingestellt und Pufferlösungen mit 5 % und 10 % MeOH hergestellt worden.

8.5.3.2 Probenlösungen

Zur Herstellung der Probenlösungen werden die Pufferlösungen (8.5.3.1) mit bidestilliertem Wasser 1:10 verdünnt, so dass man einen Phosphatpuffer mit einer Konzentration von 5 mM erhält.

Die basischen Substanzen werden mit Phosphatpuffer pH 2,5 (5 mM) gelöst und die sauren Substanzen mit Phosphatpuffer pH 6,0 (5 mM). Die erhaltenen Probenkonzentrationen variieren je nach Substanz zwischen 0,2 bis 0,5 mg / ml.

8.5.3.3 Cyclodextrin-Zusatz zum Trennpuffer

Standardmäßig wurde mit einer CD-Konzentration von 2 % im Trennpuffer gearbeitet. Dafür werden 40,0 mg des jeweiligen Cyclodextrins in 2,0 ml Phosphatpuffer (pH 2,5; 8.5.3.1) gelöst. Die hochsulfatierten Cyclodextrine (HS-CD) von Coulter Beckman, die als wässrige 20 % (w/v) Lösungen zu erhalten sind, werden auf 2,0 % verdünnt: 200 µl HS-CD Lösung werden mit Phosphatpuffer (pH 2,5) auf 2000 µl aufgefüllt.

Die positiven Cyclodextrine sind mit einer Konzentration von 1 % verwendet worden. Dazu werden 40 mg QA-CD in 4,0 ml Phosphatpuffer (pH 6,0; 8.5.3.1) gelöst.

Während der Optimierung sind auch Cyclodextrinpuffer mit 5 %, 10 % und 20 % hergestellt worden. Das entspricht Einwaagen von 100,0 mg, 200,0 mg und 400,0 mg für die Herstellung von je 2,0 ml Phosphatpufferlösung.

8.5.4 Lösungen für die HPLC-Messungen

8.5.4.1 Herstellung der Mobilen Phase

Zur Herstellung der Mobilen Phase werden 10 Volumenteile Methanol sorgfältig mit 90 Volumenteilen bedestilliertem Wasser vermischt.

8.5.4.2 Herstellung der Probenlösungen

Herstellung der Probenlösung a:

250,0 mg Substanz in einen 25-ml-Messkolben werden eingewogen, in 15 ml Mobiler Phase gelöst (1 min Ultraschall) und mit Mobiler Phase zur Marke aufgefüllt.

Herstellung der Probenlösung b:

5,0 ml der Untersuchungslösung a werden mit Mobiler Phase zu 50,0 ml verdünnt.

9 Literaturverzeichnis

- [1] Engelhardt, H.; Beck, W. and Schmitt, T., *Kapillarelektrophorese - Methoden und Möglichkeiten*. 1994, Saarbrücken.
- [2] Graf, M., *Analytik von Proteinen in der Kapillarelektrophorese*. 2006, TU Braunschweig: Braunschweig. p. 3.
- [3] Kohr, J. and Engelhard, H.; Characterization of quartz capillaries for capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, **1993**. 652(2): 309-316.
- [4] Hempel, G.; Strategies to improve the sensitivity in capillary electrophoresis for the analysis of drugs in biological fluids. *ELECTROPHORESIS*, **2000**. 21: 691-698.
- [5] Ohnesorge, J.; Sanger-Van De Griend, C. and Watzig, H.; Quantification in capillary electrophoresis-mass spectrometry: Long- and short-term variance components and their compensation using internal standards. *Electrophoresis*, **2005**. 26(12): 2360-2375.
- [6] Krivacsy, Z.; Gelencser, A.; Hlavay, J.; Kiss, G. and Sarvari, Z.; Electrokinetic injection in capillary electrophoresis and its application to the analysis of inorganic compounds. *J Chromatogr A*, **1999**. 834(1-2): 21-44.
- [7] Watzig, H.; Degenhardt, M. and Kunkel, A.; Strategies for capillary electrophoresis: Method development and validation for pharmaceutical and biological applications. *Electrophoresis*, **1998**. 19(16-17): 2695-2752.
- [8] Terabe, S.; Otsuka, K.; Ichikawa, K.; Tsuchiya, A. and Ando, T.; Electrokinetic separations with micellar solutions and open-tubular capillaries. *Japan. Analytical Chemistry*, **1984**. 56(1): 111-113.
- [9] Terabe, S.; Otsuka, K. and Ando, T.; Electrokinetic Chromatography with Micellar Solution and Open-Tubular Capillary. *Anal. Chem.*, **1985**. 57: 834-841.
- [10] Mellin, G. W. and Katzenstein, M.; The saga of thalidomide. Neuropathy to embryopathy, with case reports of congenital anomalies. *N Engl J Med.*, **1962**. 267: 1184-1192.
- [11] Shallenberger, R. S.; The AH,B glycoprotein and general taste chemistry. *Food Chemistry*, **1996**. 56(3): 209-214.
- [12] Boulton, D. W.; Arnaud, P. and Devane, C. L.; Pharmacokinetics and pharmacodynamics of methadone enantiomers after a single oral dose of racemate. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, **2001**. 70: 48-57.
- [13] Kristensen, K.; Blemmer, T.; Angelo, H. R.; Christrup, L. L.; Drenck, N. E.; Rasmussen, S. N. and Sjogren, P.; Stereoselective Pharmacokinetics of Methadone in Chronic Pain Patients. *Therapeutic Drug Monitoring*, **1996**. 18(3): 221-227.
- [14] Ruiz-Torres, A. and Kurten, I.; Pharmacokinetics and metabolism of D- and L-penicillamine. 3. Absorption, excretion, and metabolism. *Arzneimittelforschung*, **1974**. 24(9): 1258-61.

-
- [15] Stanley, J. K.; Ramirez, A. J.; Mottaleb, M.; Chambliss, K. and Brooks, B. W.; ENANTIOSPECIFIC TOXICITY OF THE β -BLOCKER PROPRANOLOL. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **2006**. 25(7): 1780-1786.
- [16] Maier, N. M. and Lidner, W., *Stereoselective Chromatographic Methods for Drug Analysis*, in *Chirality in Drug Research*, Francotte and Lindner, Editors. 2006: Weinheim. p. 189-245.
- [17] in *European Pharmacopoeia*. 2005, European Directorate for the Quality of Medicines. p. 31 - 32.
- [18] Schurig, V.; Separation of enantiomers by gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, **2001**. 906: 275-299.
- [19] Hoshino, M.; Yajima, K.; Suzuki, Y. and Okahira, A.; Determination of nadolol diastereomers in dog plasma using chiral derivatization and reversed-phase high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography B*, **1994**. 661(2): 281-289.
- [20] Kanazawa, H.; Kunito, Y.; Matsushima, Y.; Okubo, S. and Mashige, F.; Stereospecific analysis of lorazepam in plasma by chiral column chromatography with a circular dichroism-based detector. *Journal of Chromatography A*, **2000**. 871(1-2): 181-188.
- [21] Williams, R. C.; Miyawa, J. H.; Boucher, R. J. and Brockson, R. W.; Optimization and validation of chiral high-performance liquid chromatographic method for analysis of a fibrinogen (gpIIb/IIIa) receptor antagonist. *Journal of Chromatography A*, **1999**. 844(1-2): 171-179.
- [22] Kummer, M. and Werner, G.; Chiral resolution of enantiomeric steroids by high-performance liquid chromatography on amylose tris(3,5-dimethylphenylcarbamate) under reversed-phase conditions. *Journal of Chromatography A*, **1998**. 825(2): 107-114.
- [23] McCarthy, J. P.; Direct enantiomeric separation of the four stereoisomers of nadolol using normal-phase and reversed-phase high-performance liquid chromatography with Chiralpak AD. *Journal of Chromatography A*, **1994**. 685(2): 349-355.
- [24] Ishikawa, A. and Shibata, T.; Cellulosic chiral stationary phase under reversed-phase condition. *Journal of Liquid Chromatography*, **1993**. 16(4): 859-878.
- [25] Herring, V. L. and Johnson, J. A.; Direct high-performance liquid chromatographic determination in urine of the enantiomers of propranolol and its major basic metabolite 4-hydroxypropranolol. *Journal of Chromatography A*, **1993**. 612(2): 215-221.
- [26] Balmér, K.; Persson, A.; Lagerström, P.-O.; Persson, B.-A. and Schill, G.; Liquid chromatographic separation of the enantiomers of metoprolol and its α -hydroxy metabolite on Chiralcel OD for determination in plasma and urine. *Journal of Chromatography A*, **1991**. 553: 391-397.
- [27] Sharma, S. C.; Evans, M. B. and Evans, S. J.; The enantiomeric separation of metipranolol and desacetylmepipranolol on a cellulose tris-3,5-dimethylphenylcarbamate chiral stationary phase. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **1995**. 13(2): 129-137.
- [28] Ching, C. B.; Lim, B. G.; Lee, E. J. D. and Ng, S. C.; Chromatographic resolution of the chiral isomers of several β -blockers over cellulose tris(3,5-
-

- dimethylphenylcarbamate) chiral stationary phase. *Chirality*, **1992**. 4(3): 174-177.
- [29] A-Enein, H. Y. and Bakr, S. A.; *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol*, **1998**. 21: 1137-1145.
- [30] Maftouh, M.; Supercritical fluid chromatography: a procedure developed for chiral analysis for pharmaceutical products. *Spectra Analyse*, **1997**. 26(199): 25-28.
- [31] Maftouh, M.; Granier-Loyaux, C.; Chavana, E.; Marini, J.; Pradines, A.; Heyden, Y. V. and Picard, C.; Screening approach for chiral separation of pharmaceuticals Part III. Supercritical fluid chromatography for analysis and purification in drug discovery. *Journal of Chromatography A*, **2005**. 1088(1-2): 67-81.
- [32] Smith, R. M., in *Supercritical Fluid Chromatography with packed columns*, Anton and C. Berger, Editors. 1998: New York. p. 223-244.
- [33] Mukherjee, P. S.; Validation of direct assay of an aqueous formulation of a drug compound AZY by chiral supercritical fluid chromatography (SFC). *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **2007**. 43(2): 464-470.
- [34] Fanali, S.; Aturki, Z. and Desiderio, C.; New strategies for chiral analysis of drugs by capillary electrophoresis. *Forensic Science International*, **1998**. 92: 137-155.
- [35] Chankvetadze, B., *Capillary electrophoresis in chiral analysis*. 1997. 142-222.
- [36] Chankvetadze, B.; Separation selectivity in chiral capillary electrophoresis with charged selectors. *Journal of Chromatography A*, **1997**. 792(1-2): 269-295.
- [37] Gübitz, G. and Schmid, M. G.; Chiral separation principles in capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, **1997**. 792(1-2): 179-225.
- [38] Gübitz, G. and Schmid, M. G.; Recent advances in chiral separation principles in capillary electrophoresis and capillary electrochromatography. *Electrophoresis*, **2004**. 25(23-24): 3981-3996.
- [39] Nielen, M. W. F.; Chiral separation of basic drugs using cyclodextrin-modified capillary zone electrophoresis. *Anal. Chem.*, **1993**. 65(7): 885-893.
- [40] Verleysen, K. and Sandra, P.; Separation of chiral compounds by capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, **1998**. 19(16-17): 2798-2833.
- [41] Peterson, T. E.; Separation of drug stereoisomers by capillary electrophoresis with cyclodextrins. *Journal of Chromatography A*, **1993**. 630(1-2): 353-361.
- [42] Pálmarsdóttir, S. and Edholm, L.-E.; Capillary zone electrophoresis for separation of drug enantiomers using cyclodextrins as chiral selectors: Influence of experimental parameters on separation. *Journal of Chromatography A*, **1994**. 666(1-2): 337-350.
- [43] Fanali, S.; Enantioselective determination by capillary electrophoresis with cyclodextrins as chiral selectors. *Journal of Chromatography A*, **2000**. 875(1-2): 89-122.
- [44] Vargas, M. G.; Heyden, Y. V.; Maftouh, M. and Massart, D. L.; Rapid development of the enantiomeric separation of β -blockers by capillary electrophoresis using an experimental design approach. *Journal of Chromatography A*, **1999**. 855(2): 681-693.
-

-
- [45] Perrin, C.; Vargas, M. G.; Heyden, Y. V.; Maftouh, M. and Massart, D. L.; Fast development of separation methods for the chiral analysis of amino acid derivatives using capillary electrophoresis and experimental designs. *Journal of Chromatography A*, **2000**. 883(1-2): 249-265.
- [46] Garcia-Ruiz, C. and Marina, M. L.; Sensitive chiral analysis by capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, **2006**. 27: 195-212.
- [47] Ward, T. J.; Chiral Separations. *Anal. Chem.*, **2006**. 78(12): 3947 -3956.
- [48] Fanali, S.; Identification of chiral drug isomers by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, **1996**. 735(1-2): 77-121.
- [49] Phinney, K. W. and Stringham, R. W., *Chiral separations using supercritical fluid chromatography*, in *Chiral separation techniques*, Subramanian, Editor. 2007, WILEY-VCH: Weinheim. p. 135-154.
- [50] Heine-Bohnes, S., *Chirale Kapillarelektrophorese zur Bestimmung der Enantiomerenreinheit und simultaner Nachweis verwandter Substanzen von Arzneistoffen des EuAB*, in *Mathematische-Naturwissenschaftliche Fakultät*. 2005, Westfälische Wilhelms-Universität Münster: Münster. p. 1-203.
- [51] Vespalec, R. and Bocek, P.; Chiral separations in capillary electrophoresis. *Chem. Rev.*, **2000**. 100: 3715-3753.
- [52] Wren, S. A. C.; Theory of chiral separation in capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, **1993**. 636(1): 57-62.
- [53] Chankvetadze, B.; Lindner, W. and Scriba, G. K. E.; Enantiomer Separations in Capillary Electrophoresis in the Case of Equal Binding Constants of the Enantiomers with a Chiral Selector: Commentary on the Feasibility of the Concept. *Anal. Chem.*, **2004**. 76(14): 4256-4260.
- [54] Villiers, A.; *Compt. Rend. Fr. Acad. Sci.*, **1891**: 435-438.
- [55] Parrish, M. A.; Cyclodextrins - a Review. *Speciality Chemicals Magazine*, **1987**. 7(6): 366-380.
- [56] Kuhn, R.; Enantiomeric separation by capillary electrophoresis using a crown ether as chiral selector. *Electrophoresis*, **1999**. 20: 2605-2613.
- [57] Blanco, M. and Valverde, I.; Choice of chiral selector for enantioseparation by capillary electrophoresis. *Trends in Analytical Chemistry*, **2003**. 22: 428-439.
- [58] Riekkola, M.-L.; Wiedmer, S. K.; Valkó, I. E. and Sirén, H.; Selectivity in capillary electrophoresis in the presence of micelles, chiral selectors and non-aqueous media. *Journal of Chromatography A*, **1997**. 792(1-2): 13-35.
- [59] Amini, A.; Recent developments in chiral capillary electrophoresis and applications of this technique to pharmaceutical and biomedical analysis. *Electrophoresis*, **2001**. 22: 3107-3130.
- [60] Gübitz, G. and Schmid, M. G.; Recent progress in chiral separation principles in capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, **2000**. 21(18): 4112-4135.
- [61] Nishi, H.; Izumoto, S.; Nakamura, K.; Nakai, H. and Sato, T.; Dextran and dextrin as chiral selectors in capillary zone electrophoresis. *Chromatographia*, **1996**. 42: 617-630.
- [62] Nishi, H.; Enantioselectivity in chiral capillary electrophoresis with polysaccharides. *Journal of Chromatography A*, **1997**. 792(1-2): 327-347.
-

-
- [63] Gasper, M. P.; Berthod, A.; Nair, U. B. and Armstrong, D. W.; Comparison and Modeling Study of Vancomycin, Ristocetin A, and Teicoplanin for CE Enantioseparations. *Analytical Chemistry*, **1996**. 68(15): 2501-2514.
- [64] Nishi, H.; Fukuyama, T. and Terabe, S.; Chiral separation by cyclodextrin-modified micellar electrokinetic chromatography. *Journal of Chromatography A*, **1991**. 553(1-2): 503-516.
- [65] Palmer, C. P. and McCarney, J. P.; Recent progress in the use of soluble ionic polymers as pseudostationary phases for electrokinetic chromatography. *Electrophoresis*, **2004**. 25(23-24): 4086-4094.
- [66] Schmid, M. G.; Grobuschek, N.; Lecnik, O. and Gübitz, G.; Chiral ligand-exchange capillary electrophoresis. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, **2001**. 48(2): 143-154.
- [67] <http://www.ich.org>.
- [68] Bitar, Y.; Degel, B.; Schirmeister, T. and Holzgrabe, U.; Development and validation of a separation method for the diastereomers and enantiomers of aziridine-type protease inhibitors. *Electrophoresis*, **2005**. 26(12): 2313-2319.
- [69] Fda, *Guidelines For Submitting Samples and Analytical Data for Methods Validation*, FDA, Editor. 1987, US Government Printing Office. p. 20818.
- [70] Altria, K. D. and Rudd, D. R.; An overview of method validation and system suitability aspects in capillary electrophoresis. *Chromatographia*, **1995**. 41(5/6): 325-331.
- [71] Altria, K. D., *Capillary Electrophoresis Guidebook*. 1996: Humana Press.
- [72] Kunkel, A.; Degenhardt, M.; Schirm, B. and Wätzig, H.; Performance of instruments and aspects of methodology and validation in quantitative capillary electrophoresis an update. *Journal of Chromatography A*, **1997**. 768(1): 17-27.
- [73] Rudd, D., *Qualification of analytical equipment*, in *Method validation in pharmaceutical analysis*, Ermer and Miller, Editors. 2005, WILEY-VCH: Weinheim.
- [74] Wätzig, H. and Dette, C.; *J. Anal. Chem.*, **1993**. 345: 403-410.
- [75] Wätzig, H. and Dette, C.; *J. Chromatogr.*, **1993**. 636: 31-38.
- [76] Altria, K. D.; Improved Performance in Capillary Electrophoresis using Internal Standards. *LC/GC Europe*, **2002**. 15(9): 588-594.
- [77] Pappas, T. J.; Gayton-Ely, M. and Holland, L. A.; Recent advances in micellar electrokinetic chromatography. *Electrophoresis*, **2005**. 26(4-5): 719-734.
- [78] Otsuka, K. and Terabe, S.; Micellar Electrokinetic Chromatography. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, **1998**. 71(11): 2465-2481.
- [79] Scifinder. <http://www.cas.org/SCIFINDER/>.
- [80] Andersen, K. E.; Bjerregaard, C. and Sørensen, H.; Analysis of Reducing Carbohydrates by Reductive Tryptamine Derivatization Prior to Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography. *J. Agric. Food Chem.*, **2003**. 51: 7234-7239.
- [81] Houzé, P.; Micellar electrokinetic capillary chromatography quantification of cytosine arabinoside and its metabolite, uracil arabinoside, in human serum. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, **2001**. 754: 185-192.
-

-
- [82] Paugam, L.; Ménard, R.; Larue, J.-P. and Thouvenot, D.; Optimization of glucosinolate separation by micellar electrokinetic capillary chromatography using a Doehlert's experimental design. *Journal of Chromatography A*, **1999**. 864(1): 155-162.
- [83] Zamora, R.; Navarro, J. L. and Hidalgo, F. J.; Determination of lysine modification product β -N-pyrrolylnorleucine in hydrolyzed proteins and trout muscle microsomes by micellar electrokinetic capillary chromatography. *Lipids*, **1995**. 30: 477-83.
- [84] Dugan, M. E. R.; Thacker, R. D.; Aalhus, J. L.; Jeremiah, L. E. and Lien, K. A.; Analysis of 4-hydroxyproline using 4-chloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol derivatization and micellar electrokinetic chromatography combined with laser-induced fluorescence detection. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, **2000**. 744: 195-199.
- [85] Soini, H.; Tsuda, T. and Novotny, M. V.; Electrochromatographic solid-phase extraction for determination of cimetidine in serum by micellar electrokinetic capillary chromatography. *Journal of Chromatography A*, **1991**. 559: 547-558.
- [86] Wu, H.-L.; Huang, C.-H.; Chen, S.-H. and Wu, S.-M.; Micellar electrokinetic chromatography of scopolamine-related anticholinergics. *Journal of Chromatography A*, **1998**. 802: 107-113.
- [87] Terabe, S.; Selectivity manipulation in micellar electrokinetic chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **1992**. 10(10-12): 705-715.
- [88] Hayashi, Y.; Matsuda, R. and Terabe, S.; Optimization of Precision and Throughput in Micellar Electrokinetic Chromatography. *Chromatographia*, **1993**. 37(3-4): 149-156.
- [89] Terabe, S., *Micellar Electrokinetic Chromatography*, Redwood City: Herb Schwartz. 46.
- [90] Pirogov, A.; Stepanov, K. and Shpigun, O.; Electrophoretic determination of phenols in capillaries modified by cationic polyelectrolytes. *Analytical Sciences*, **2001**. 17: 129-131.
- [91] Nishi, H.; Fukuyama, T.; Matsuo, M. and Terabe, S.; Effect of surfactant structures on the separation of cold medicine ingredients by micellar electrokinetic chromatography. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **1990**. 79(6): 519-523.
- [92] Otsuka, K.; Terabe, S. and Ando, T.; Quantitation and reproducibility in electrokinetic chromatography with micellar solutions. *Journal of Chromatography A*, **1987**. 396: 350-354.
- [93] Zou, D.; Wu, X. and Nan, G.; Determination of sulfamethoxazole, sulfadiazine and trimethoprim in tablets by capillary zone electrophoresis. *Zhongguo Yaoxue Zazhi*, **1998**. 33(2): 106-108.
- [94] Han, F.-M.; Cheng, Z.-Y.; Cai, M. and Chen, Y.; Separation and determination of glibenclamide in Xiaotangling tablets by micellar electrokinetic capillary chromatography. *Peop. Rep. China*, **2000**. 18(5): 456-458.
- [95] Albrecht, C. and Thormann, W.; Determination of naproxen in liver and kidney tissues by electrokinetic capillary chromatography with laser-induced fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, **1998**. 802(1): 115-120.
-

-
- [96] Chen, C.-T. and Sheu, S.-J.; Separation of coumarins by micellar electrokinetic capillary chromatography. *Journal of Chromatography A*, **1995**. 710(2): 323-329.
- [97] Paxson, T. L.; Powell, P. R.; Lee, H.-G.; Han, K.-A. and Ewing, A. G.; Microcolumn Separation of Amine Metabolites in the Fruit Fly. *Anal. Chem.*, **2005**. 77(16): 5349-5355.
- [98] Hillaert, S. and Bossche, W. V. D.; Determination of captopril and its degradation products by capillary electrophoresis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **1999**. 21(1): 65-73.
- [99] Riaz, A. and Chung, D. S.; Calibration of migration times of variable salinity samples with internal standards in capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, **2006**. 27(3): 553-562.
- [100] Batten; M., A.; Davidian; W., E.; Barker and E., G.; Development of a method for the analysis of benzocaine in throat lozenges using an internal standard micellar electrokinetic chromatography. *Book of Abstracts, 214th ACS National Meeting*, **1997**. 214.
- [101] Kuroda, N.; Nomura, R.; Al-Dirbashi, O.; Akiyama, S. and Nakashima, K.; Determination of methamphetamine and related compounds by capillary electrophoresis with UV and laser-induced fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, **1998**. 798: 325-334.
- [102] Liu, L.; Liu, X. and Chen, X.; Separation and determination of tetrandrine and fangchinoline in herbal medicines by flow injection-micellar electrokinetic capillary chromatography with internal standard method. *Journal of Chromatography A*, **2005**. 1098: 177-182.
- [103] Na, P.-J. and Wu, X.-H.; Analysis of alkaloids in *Sophora tonkinensis* Gapnep by CZE and MEKC. *Ningxia Gongcheng Jishu*, **2004**. 3: 46-47, 50.
- [104] Dibbern, H.-W., in *UV and IR Spectra of Some Important Drugs*. 2005, Editor Cantor Aulendorf.
- [105] Schirm, B. and Wätzig, H.; Peak recognition imitating human judgement. *Chromatographia*, **1998**. 48(5-6): 331-346.
- [106] Suntornsuk, L.; Separation of cold medicine ingredients by capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, **2001**. 22: 139-143.
- [107] Pappas, T. J.; Gayton-Ely, M. and Holland, L. A.; Recent advances in micellar electrokinetic chromatography. *Electrophoresis*, **2005**. 26(4): 719-734.
- [108] Bailey, D. J. and Dorsey, J. G.; pH effects on micelle-water partitioning determined by micellar electrokinetic chromatography. *Journal of Chromatography A*, **1999**. 852: 559-571.
- [109] Mazzeo, J. R., *Micellar Electrokinetic Chromatography*, in *Handbook of Capillary Electrophoresis*, Landers, Editor. 1997, CRC Press: New York. p. 49-70.
- [110] Muijselaar, P. G. H. M.; Claessens, H. A. and Cramers, C. A.; Parameters controlling the elution window and retention factors in micellar electrokinetic capillary chromatography. *Journal of Chromatography A*, **1995**. 696(2): 273-284.
-

-
- [111] Ràfols, C.; Poza, A.; Fuguet, E.; Rosés, M. and Bosch, E.; Solute-solvent interactions in micellar electrokinetic chromatography: V. Factors that produce peak splitting. *Electrophoresis*, **2002**. 23(15): 2408-2416.
- [112] Crabtree, H. J.; Ireland, I. D. and Dovichi, N. J.; Effect of acetonitrile in the sampling solution on the analyte peak shape in micellar electrokinetic capillary chromatography. *Journal of Chromatography A*, **1994**. 669(1-2): 263-267.
- [113] Hasemann, P.; Ter Balk, M. and Wätzig, H.; Analysis of substances to be used as internal standards in MEKC. *Electrophoresis*, **2007**. 28(11): 1798-1804.
- [114] Clarke, E. G. C., *Clarke's Isolation and Identification of Drugs: In Pharmaceuticals, Body Fluids and Post Mortem Material*. 2 ed, ed. Moffat. 1986: Pharmaceutical Press. 1200.
- [115] I. Fitos, J. V.; Simonyi, M. and Hermansson, J.; Separation of enantiomers of benzodiazepines on the Chiral-AGP column. *Journal of Chromatography A*, **1995**. 709(2): 265-273.
- [116] Perrin, C. H., Y. V.; Maftouh, M.; Massart, D. L.; Rapid screening for chiral separations by short-end injection capillary electrophoresis using highly sulfated cyclodextrins as chiral selectors. *Electrophoresis*, **2001**. 22(15): 3205-3215.
- [117] Chapman, J. and Chen, F.-T. A.; Implementing a generic methods development strategy for enantiomer analysis. *LC-GC Europe*, **2001**. 14(1): 33-37.
- [118] Porras, S. P. and Kenndler, E.; Are the Asserted Advantages of Organic Solvents in Capillary Electrophoresis Real? A Critical Discussion. *Electrophoresis*, **2005**. 26: 3203-3220.
- [119] Jimidar, M. I.; Ael, W. V.; Nyen, P. V.; Peeters, M.; Redlich, D. and Smet, M. D.; A screening strategy for the development of enantiomeric separation methods in capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, **2004**. 25(16): 2772-2785.
- [120] Fillet, M.; Hubert, P. and Crommen, J.; Method development strategies for the enantioseparation of drugs by capillary electrophoresis using cyclodextrins as chiral additives. *Electrophoresis*, **1998**. 19(16-17): 2834-2840.
- [121] Roosa, N.; Ganzlerb, K.; Szemána, J. and Fanali, S.; Systematic approach to cost- and time-effective method development with a starter kit for chiral separations by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, **1997**. 782(2): 257-269.
- [122] Validation of Analytical Procedures. *International Conference on Harmonisation*, **2005**. Q2(R1)(Step 5).
- [123] Impurities in New Drug Substances. *International Conference on Harmonisation*, **2006**. Q3A(R2)(Step 5).
- [124] Impurities in New Drug Products. *International Conference on Harmonisation*, **2006**. Q3B(R2)(Step 5).
- [125] Test Procedures and Acceptance Criteria for New Drug Substances and New Drug Products. *International Conference on Harmonisation*, **1999**. Q6A(Step 5).
- [126] El Deeb, S., *High Efficiency Separation Techniques: Fast HPLC Using Monolithic Silica Columns and Chiral Separation Using Capillary Zone Electrophoresis*. 2007. p. 121.
-

-
- [127] Williams, B. A. and Vigh, G.; Dry look at the CHARM (charged resolving agent migration) model of enantiomer separations by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A.*, **1997**. 777: 295-309.
- [128] Matthijsa, N.; Perrin, C.; Maftouh, M.; Massart, D. L. and Heyden, Y. V.; Knowledge-based system for method development of chiral separations with capillary electrophoresis using highly-sulphated cyclodextrins. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2002**. 27: 515-529.
- [129] Liu, L.; Liu, X. and Chen, X.; Separation and determination of tetrandrine and fangchinoline in herbal medicines by flow injection-micellar electrokinetic capillary chromatography with internal standard method. *J. Chromatogr. A.*, **2005**. 1098: 177-182.
- [130] Evans, C. and Stalcup, A. M.; Comprehensive strategy for chiral separations using sulfated cyclodextrins in capillary electrophoresis. *Chirality*, **2003**. 15: 709-723.
- [131] Zhu, W. and Vigh, G.; Separation selectivity patterns in the capillary electrophoretic separation of anionic enantiomers by octakis-6-sulfato- γ -cyclodextrin. *Electrophoresis*, **2001**. 7: 1394-1398.
- [132] Castro-Puyana, M.; Lomsadze, K.; Crego, A. L.; Marina, M. L. and Chankvetadze, B.; Separation of enantiomers of deprenyl with various CDs in CE and the effect of enantiomer migration order on enantiomeric impurity determination of selegiline in active ingredients and tablets. *Electrophoresis*, **2007**. 28(3): 388-394.
- [133] Wren, S. A. C. and Rowe, R. C.; Theoretical aspects of chiral separation in capillary electrophoresis: III. Application to β -blockers. *J. Chromatogr. A.*, **1993**. 635: 113-118.
- [134] Ferrara, G.; Santagati, N. A.; Aturki, Z. and Fanali, S.; Optical isomer separation of potential analgesic drug candidates by using capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, **1999**. 20: 2432-2437.
- [135] Lipka, E.; Daniel, C.; Vaccher, M.-P.; Glaçon, V.; Ewing, D.; Mackenzie, G.; Len, C.; Bonte, J.-P. and Vaccher, C.; Enantioseparation of new nucleoside analogs, related to d4T and acyclovir, by chiral capillary electrophoresis using highly sulfated -cyclodextrins. *Electrophoresis*, **2004**. 25(3): 444-453.
- [136] Süß, F.; Harang, V.; Griend, C. E. S.-V. D. and Scriba, G. K. E.; Development and validation of a robust capillary electrophoresis method for impurity profiling of calcium levofolinate including the (6R,2'S)-diastereomer using statistical experimental design. *Electrophoresis*, **2004**. 24(4-5): 766-777.
- [137] Eeckhaut, A. V. and Michotte, Y.; Chiral separations by capillary electrophoresis: Recent developments and applications. *Electrophoresis*, **2006**. 27(14): 2880-2895.
- [138] Fillet, M.; Chankvetadze, B.; Crommen, J. and Blaschke, G.; Designed combination of chiral selectors for adjustment of enantioseparation selectivity in capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, **1999**. 20(13): 2691-2697.
- [139] Chankvetadze, B.; Burjanadze, N.; Crommen, J. and Blaschke, G.; Enantioseparation of warfarin by capillary electrophoresis with UV and LIF detection using single and dual cyclodextrin type chiral selectors. *Chromatographia*, **2001**. 53(1): 296-301.
-

- [140] Fillet, M.; Hubert, P. and Crommen, J.; Enantiomeric separations of drugs using mixtures of charged and neutral cyclodextrins. *Journal of Chromatography A*, **2000**. 875(1-2): 123-134.
- [141] Castro-Puyana, M.; Crego, A. L.; Marina, M. L. and García-Ruiz, C.; Enantioselective separation of azole compounds by EKC. Reversal of migration order of enantiomers with CD concentration. *Electrophoresis*, **2007**. 28(15): 2667-2674.
- [142] Analytical Instrument Qualification. *United States Pharmacopeia*, **2008**. Chapter <1058>.
- [143] Song, D. and Wang, J.; Modified resolution factor for asymmetrical peaks in chromatographic separation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **2003**. 32(6): 1105-1112.
- [144] Schulz, W. B.; *Federal Register*, **1995**. 60: 11260-11262.
- [145] Kelly, M. A.; Altria, K. D.; Graceb, C. and Clarka, B. J.; Optimization, validation and application of a capillary electrophoresis method for the determination of ranitidine hydrochloride and related substances. *Journal of Chromatography A*, **1998**. 798(1-2): 297-306.
- [146] Green, J. M.; *Anal. Chem. News and Features*, **1996**. 68: 305A-309A.
- [147] Flemming, J.; Albus, H.; Neidhart, B. and Wegscheider, W.; *Accred. Qual. Assur.*, **1997**. 2: 51-61.

10 Anhänge

10.1 Glossar zur Methodenvvalidierung gemäß ICH [67]

Name	Definition
Richtigkeit (engl.: Accuracy)	Die Richtigkeit gibt die Übereinstimmung des Mittelwerts einer Bestimmung vom wahren Wert an [67]. Abweichung durch systematischen Fehler.
Nachweisgrenze (engl.: Detection Limit; DL)	Die Nachweisgrenze ist die niedrigste Masse oder der niedrigste Gehalt, der mit einer Methode noch zuverlässig nachgewiesen werden kann [67].
Bestimmungsgrenze (engl.: Quantitation Limit; QL)	Die Bestimmungsgrenze ist die niedrigste Masse oder der niedrigste Gehalt, der mit einer Methode bei akzeptabler Präzision und Richtigkeit quantitativ bestimmt werden kann [67, 144].
Arbeitsbereich (engl.: Range)	Der Arbeitsbereich oder auch Bestimmungsbereich ist das Konzentrationsintervall, in welchem der zu bestimmende Stoff mit angegebener Präzision und Richtigkeit bestimmt werden kann [67].
Präzision (engl.: Precision)	Die Präzision ist das Maß für die Streuung von Analysenergebnissen [67] (allg. Umschreibung, die System-, Wiederhol- und Vergleichspräzision mit einschließt). Zur Angabe der Streuung von Ergebnissen wird die relative Standardabweichung (seltener Varianz) verwendet. Abweichung durch zufälligen Fehler.

Systempräzision (engl.: System precision)	Die Systempräzision wird unter Ausschluss aller Einflussgrößen, bis auf die Geräteparameter, auf ein Analysenergebnis erhalten. Dabei wird innerhalb eines kurzen Zeitintervalls und unter gleichen Bedingungen dieselbe Lösung (eine Probenaufarbeitung) mehrmals vermessen.
Wiederholpräzision (engl.: Intra-assay precision, Repeatability)	Die Messung wird unter den selben Bedingungen mit dem gleichen Gerät im gleichen Labor vom gleichen Analytiker mehrmals wiederholt (z. B. 10 Injektionen) [67, 70, 144, 145]. Die Probevorbereitung wird jeweils separat durchgeführt.
Intermediate Precision (Laborpräzision; engl. auch: day-to-day precision)	Die Methode wird im gleichen Labor durchgeführt, dabei können einzelne Parameter variieren (z. B. verschiedene Analytiker, an verschiedenen Tagen,...) [67]
Vergleichspräzision (engl.: Reproducibility)	Die Methode wird, z. B. in Form eines Ringversuches, in verschiedenen Laboren durchgeführt. Dabei können sowohl verschiedene Analytiker, als auch unterschiedliche Geräteausrüstungen zum Einsatz kommen [67, 145].
Wiederfindung (engl. Recovery)	Verhältnis zwischen der wiedergefundenen Substanzmenge und der zugesetzten Substanzmenge [67, 146]. (vgl. Richtigkeit)

Robustheit (engl.: Robustness)	Die Robustheit entspricht der Widerstandsfähigkeit einer Methode gegenüber äußeren Einflüssen und Störeffekten (z. B. Temperatur- und Lichteinflüsse, Herkunft, Stabilität und Alter von Reagenzien und Lösungen) [67, 144]
Empfindlichkeit (engl.: Sensitivity)	Maß für den Zuwachs des Messsignals je Zunahme um eine Konzentrationseinheit der zu bestimmenden Substanz. Steigung der Kalibriergeraden [147]
Selektivität (engl.: Specificity)	Die Selektivität (Spezifität) gibt an, in wie weit die eine Substanz in Anwesenheit von anderen Stoffen (Matrix: Hilfsstoffen, Verunreinigungen,...) präzise und richtig bestimmt werden kann [67, 144].
Linearität (engl. Linearity)	Proportionalität zwischen dem Messergebnis und der Stoffmenge (Konzentration) [67]
Validierung (engl.: Validation)	<p>Mit der Methodenvvalidierung wird der Nachweis erbracht, dass sich eine Analysenmethode aufgrund ihrer Leistungsmerkmale für die vorgesehene Anwendung eignet.</p> <p>Es müssen alle Prozesse einer Methode berücksichtigt werden, darunter die Probennahme, die Probenvorbereitung, die Trennmethode sowie die Erfassung und Auswertung.</p> <p>Ziel einer Methodenvvalidierung ist es nachzuweisen, dass die Methode zuverlässig und reproduzierbar das tut, was von ihr erwartet wird.</p>

10.2 Aspekte einer Risikoanalyse zur Validierung von CE-Methoden

PRÄZISION
Wellenlängenreproduzierbarkeit und Richtigkeit (Gerätespezifikation, Lampenleistung, Eigenabsorption der Pufferlösung und Probenmatrix) (→ Empfindlichkeit, Response-Faktor)
Heteroskedastizität
Präzision der Peakflächen (Probeninjektion, Stabilität der Probelösungen) (→ System-, Wiederhol- und Vergleichspräzision)
Präzision der Migrationszeiten (Elektrisches Feld, Stabilität des elektroosmotischen Flusses, Stabilität der Pufferlösung) (→ System-, Wiederhol- und Vergleichspräzision)
Vorgehensweise zur Erkennung und Bewertung von Ausreißern
Integrationsparameter und – software (→ Vergleichspräzision)
SELEKTIVITÄT
Basislinientrennung aller enthaltenen Probenbestandteile (→ Richtigkeit, Wiederfindung)
Peakform (→ Auflösung, Richtigkeit)
LINEARITÄT UND ARBEITSBEREICH
Spezifizierung des zu validierenden Konzentrationsbereichs
NACHWEISGRENZE (DL) & BESTIMMUNGSGRENZE (QL)
Drift, Basislinienrauschen, Basislinienoszillation (Geräte-Interferenzen)
METHODENROBUSTHEIT
Einflussgrößen, die zur Bestimmung der Methodenrobustheit variiert werden: Analytiker, pH-Wert der Pufferlösung, Konzentration und Ionenstärke der Pufferlösung, CE-Instrument, Detektorlampe, Alter der verwendeten Reagenzien, Verwendung verschiedener Chargen, Temperatur, Zeitdauer und Intensität der Spülprozeduren, Aktivierung der Kapillare, Konzentration der Pufferzusätze (chiraler Selektor, Tenside, organische Modifier), Detektorwellenlänge, Injektionsbedingungen (Druck & Zeitdauer), Kapillaren

Messgrößen, die zur Bestimmung der Methodenrobustheit erfasst werden:

Migrationszeit des elektroosmotischen Fluss' (t_{EOF}), absolute Peakflächen und relative Peakflächen (bezogen auf die Migrationszeit), RSD% der Peakflächen, Auflösung dicht benachbarter Peaks

ACCURACY

Crossvalidierung (Referenzmethode)

Wiederfindung (Verluste durch Wandadsorption)

"CE-typische" Faktoren

Bandenverbreiterung

EOF Stabilität

Injektionsmethode und Anordnung der Vials im Probenkarussell

Konditionieren und Equilibrieren der Kapillare (Aktivierung)

Kühlsystem des CE-Gerätes (Heatingeffekte)

Qualität der Reagenzien (Chargenkonformität)

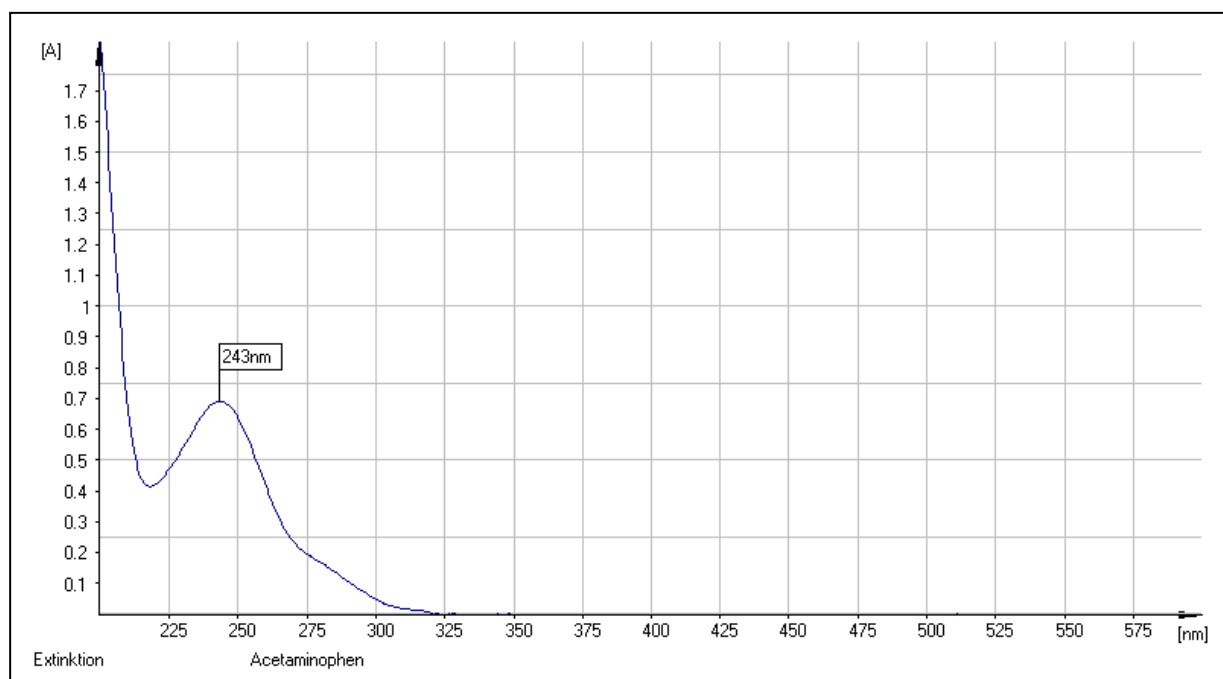
Stabilität der Probe- und Pufferlösungen

Reproduzierbarkeit zwischen Kapillaren

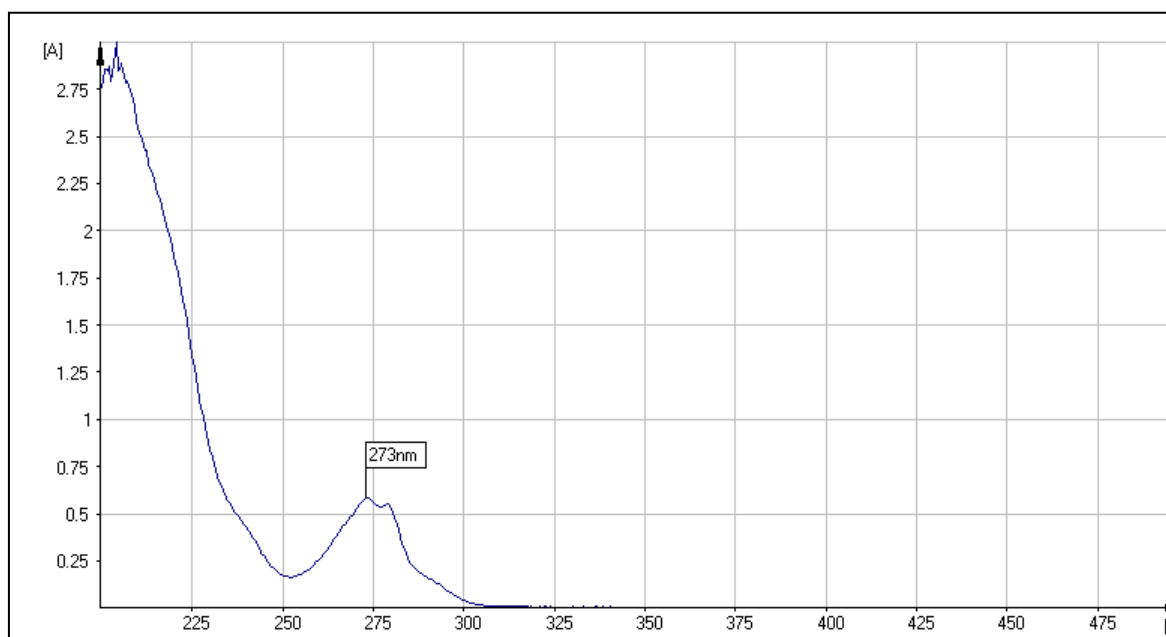
10.3 UV-Spektrenset der untersuchten IS-Substanzen

Die Substanzen sind im Trennpuffer (IS-Standardmethode) gelöst (8.5.1.4) und in einer Quarzküvette (Schichtdicke: 10 dm) vermessen worden. Um den Arbeitsbereich des Spektrometers einzuhalten, sind die Probelösungen je nach Absorption 1:10 oder 1:25 mit SDS-Boratpuffer (8.5.1.3) verdünnt worden. Dafür ist eine Kalibrierung des UV-Spektrometers gegen den SDS-Boratpuffer erfolgt.

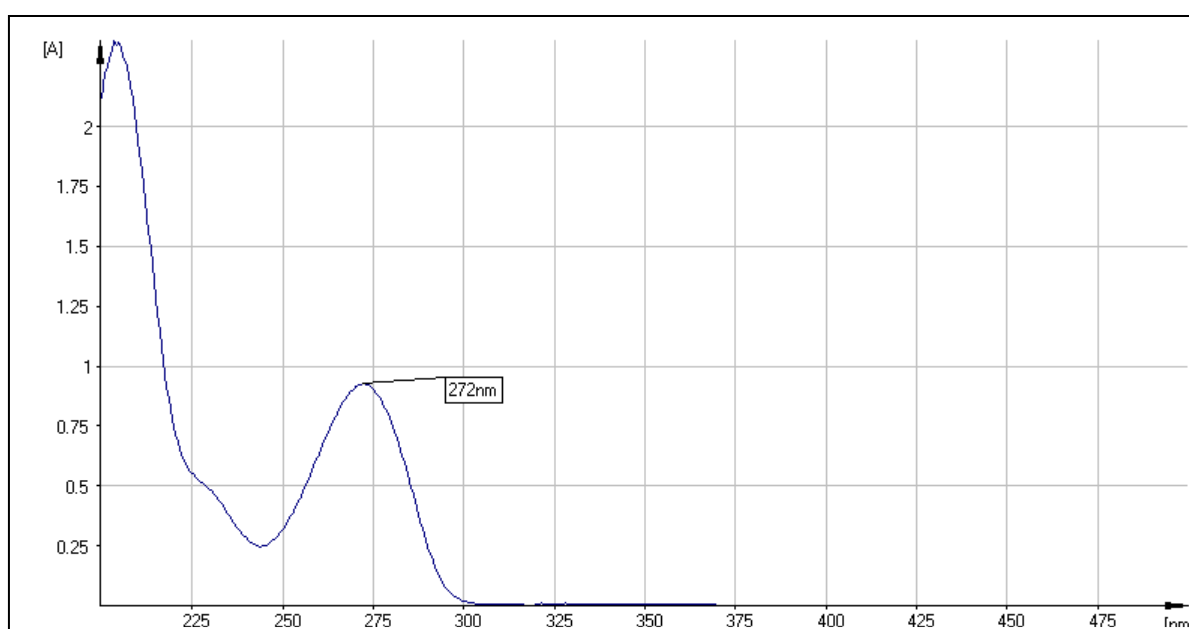
1. Paracetamol



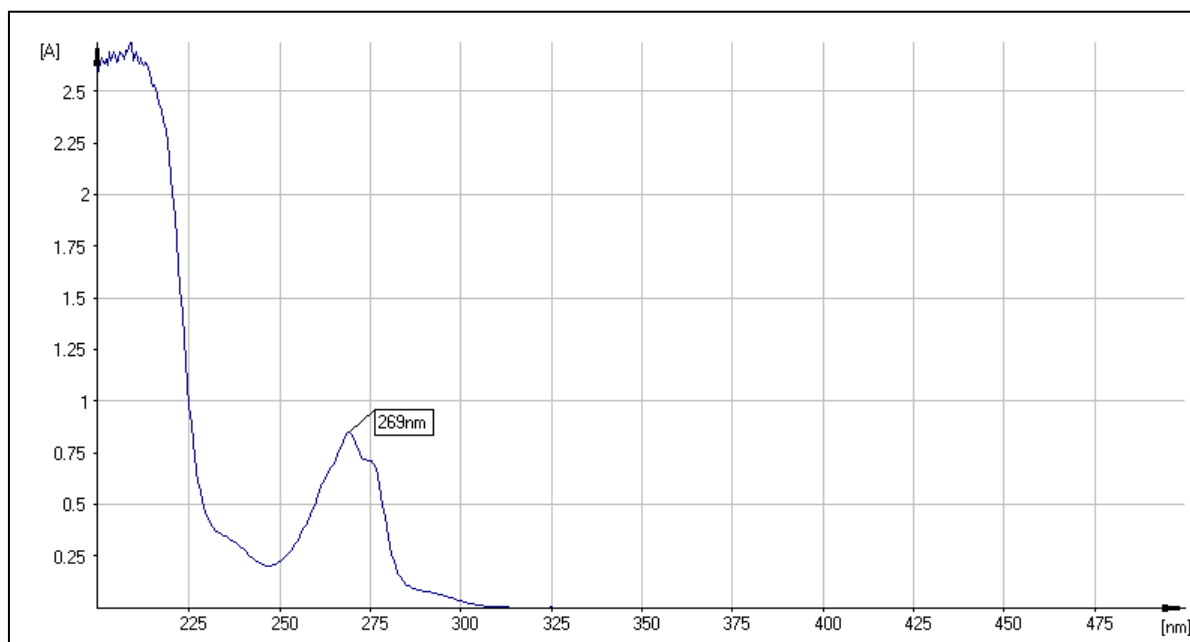
2. Resorcin



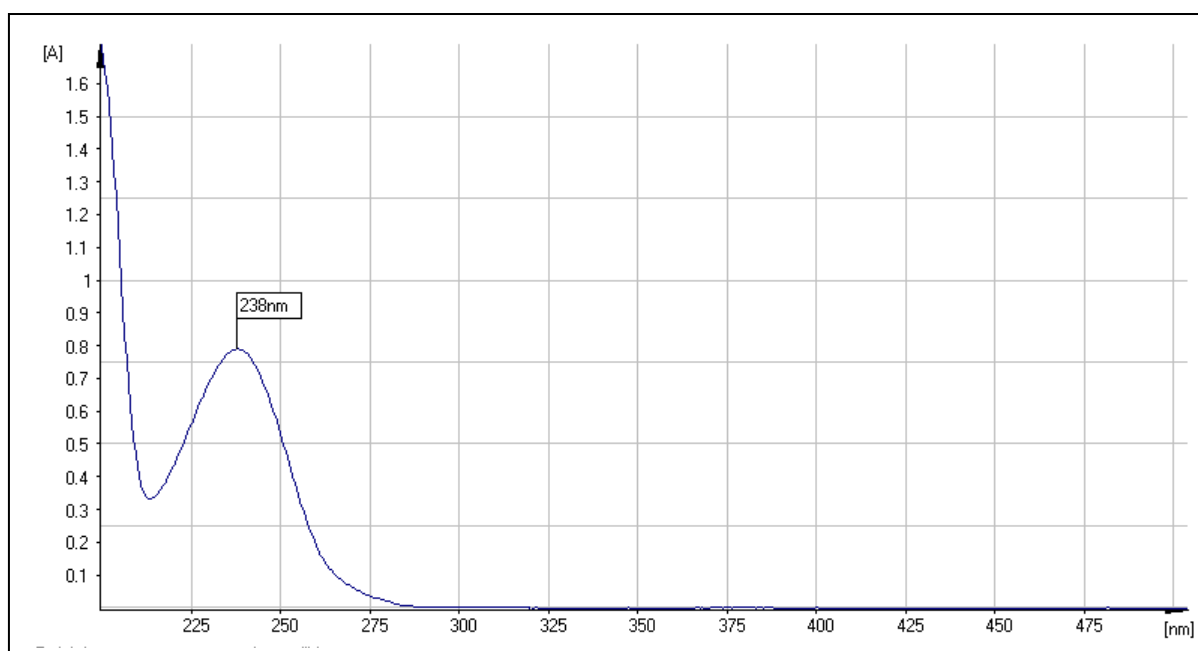
3. Coffein



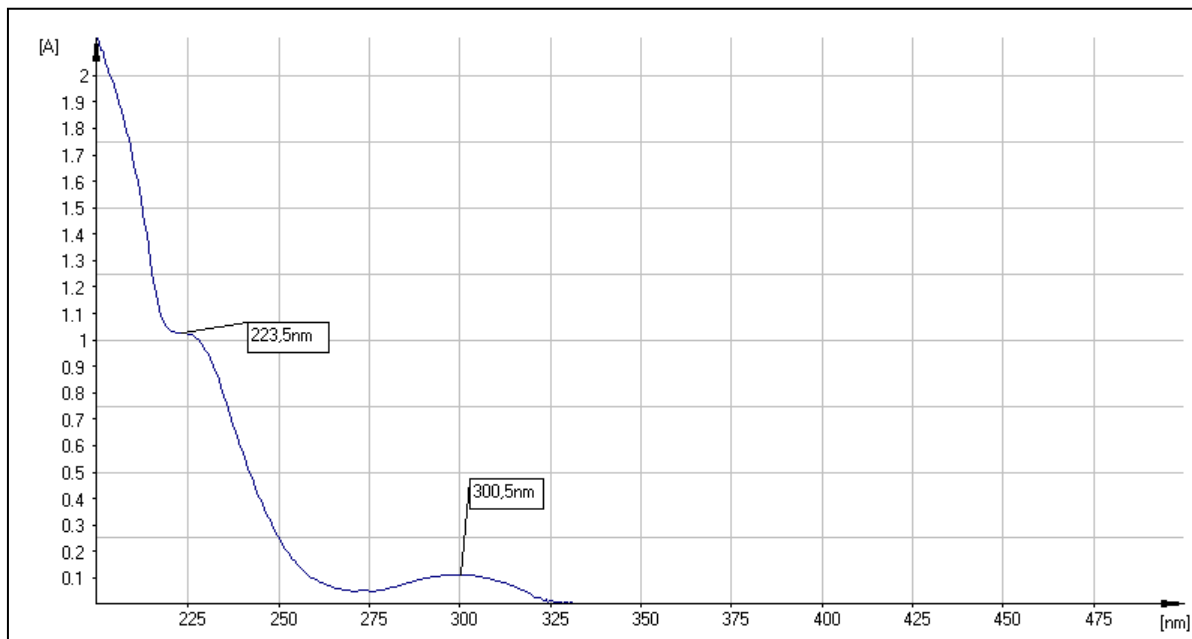
4. Phenol



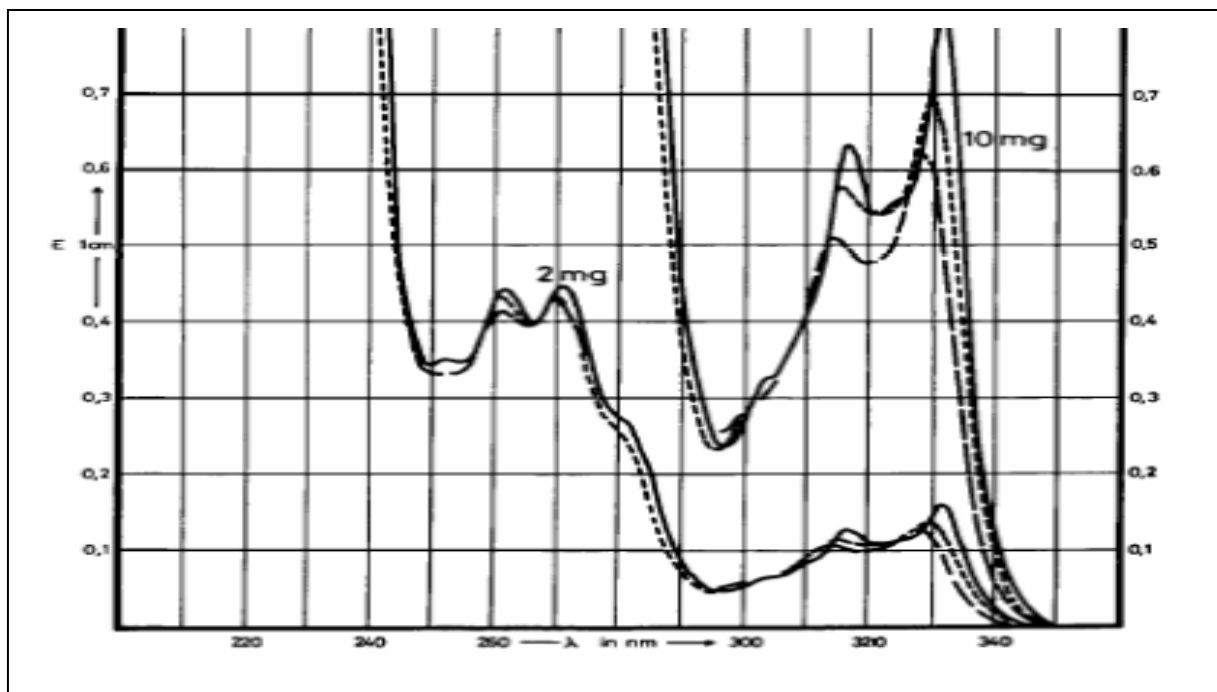
5. Acetanilid



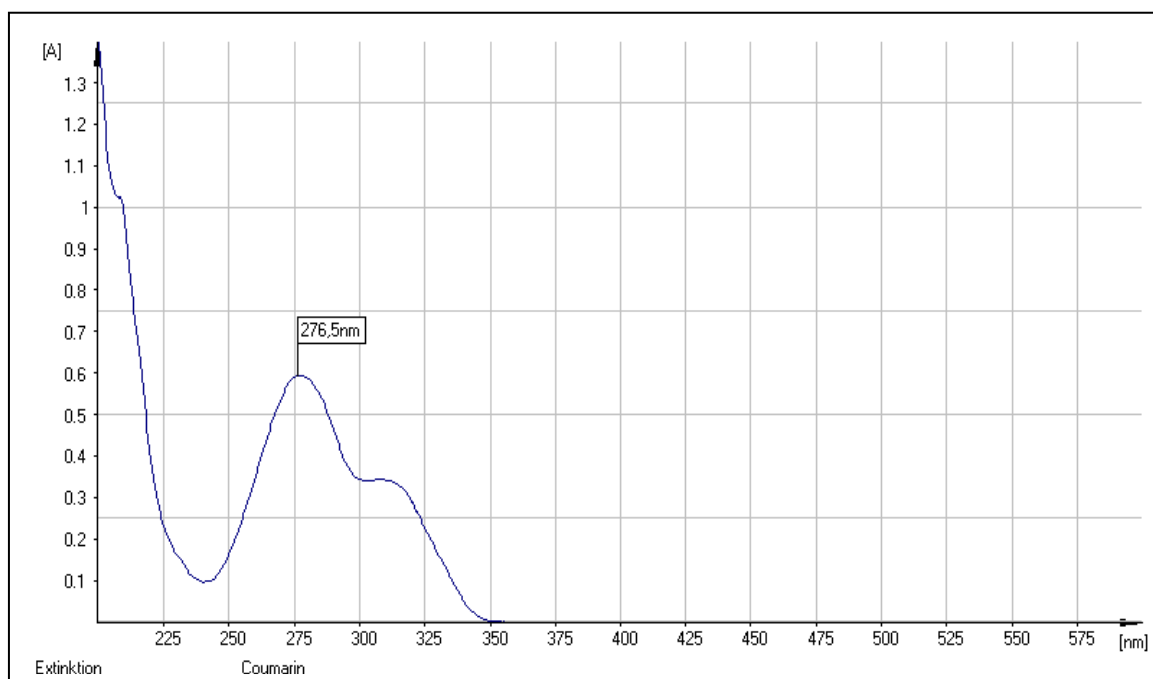
6. Glibenclamid



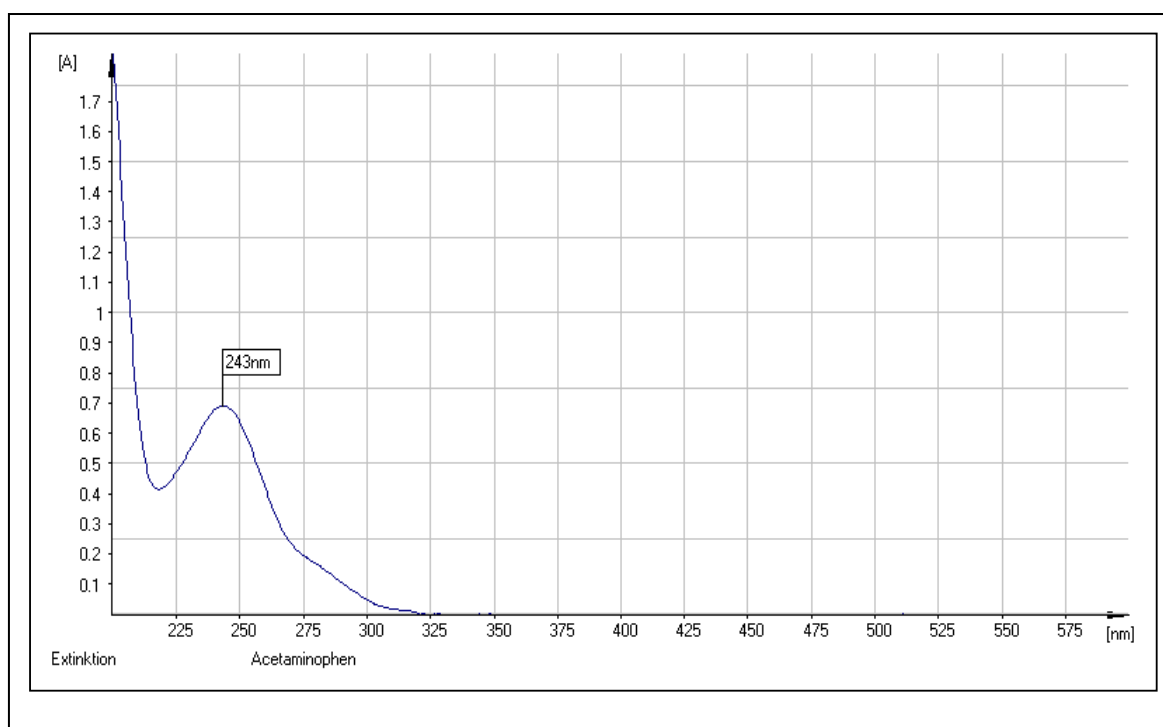
7. Naproxen *



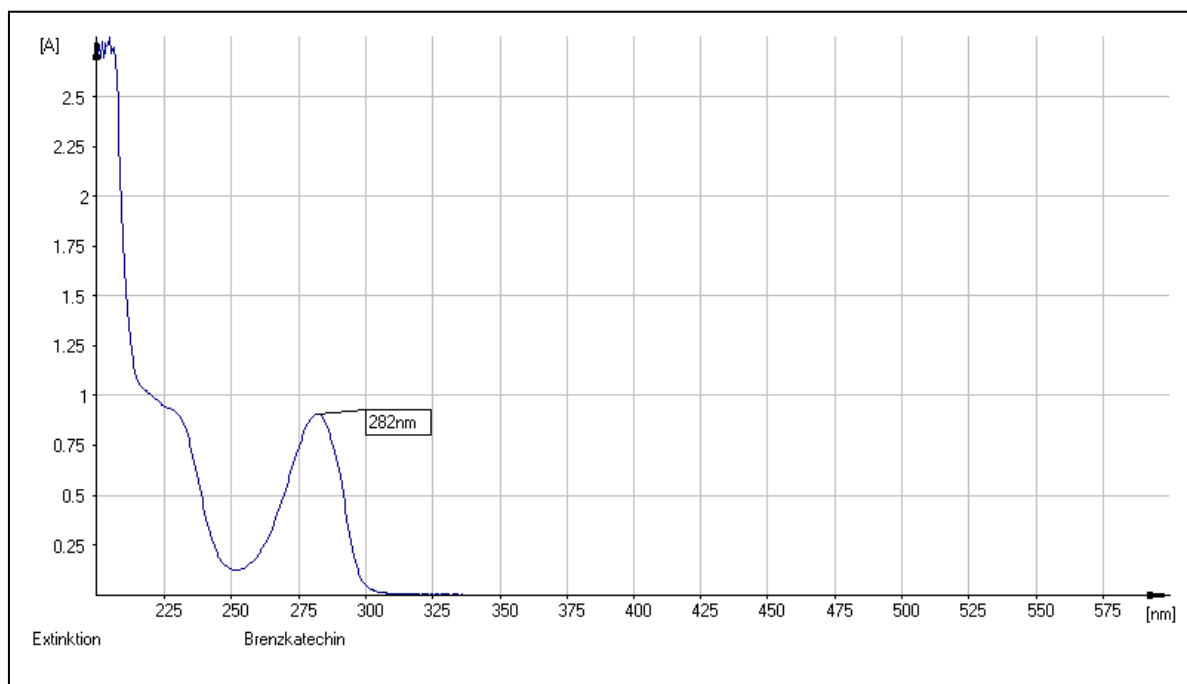
8. Cumarin



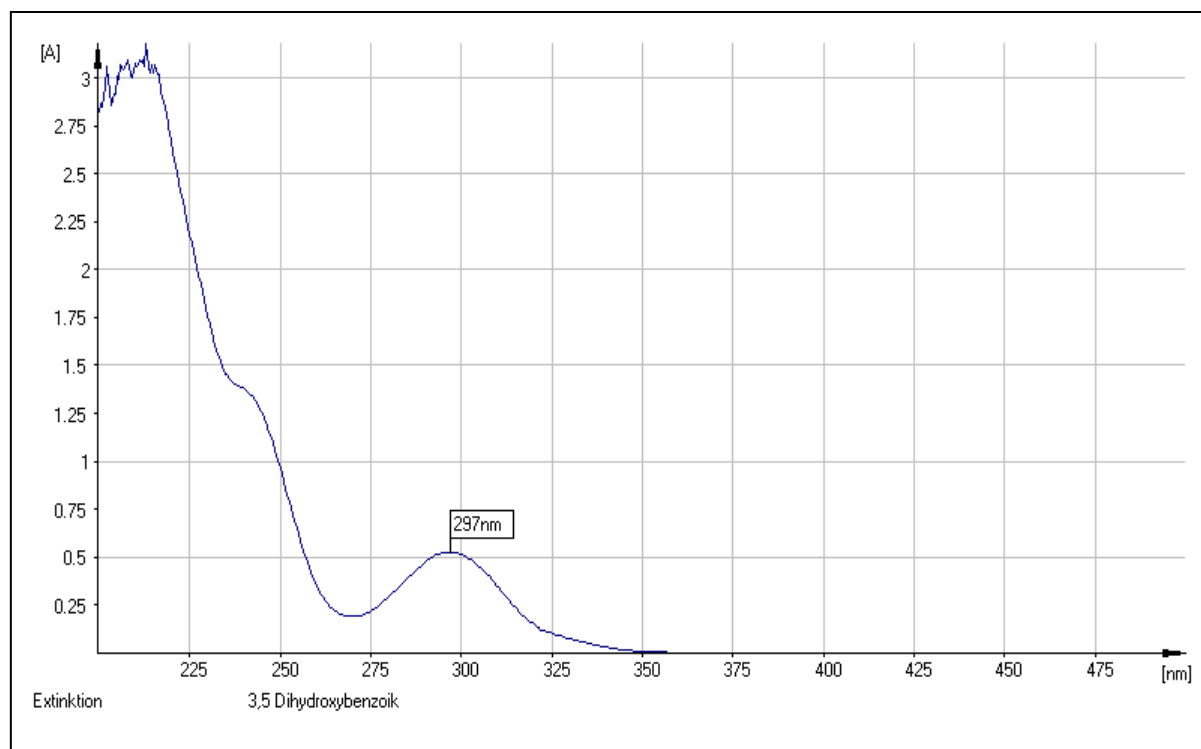
9. Phenacetin



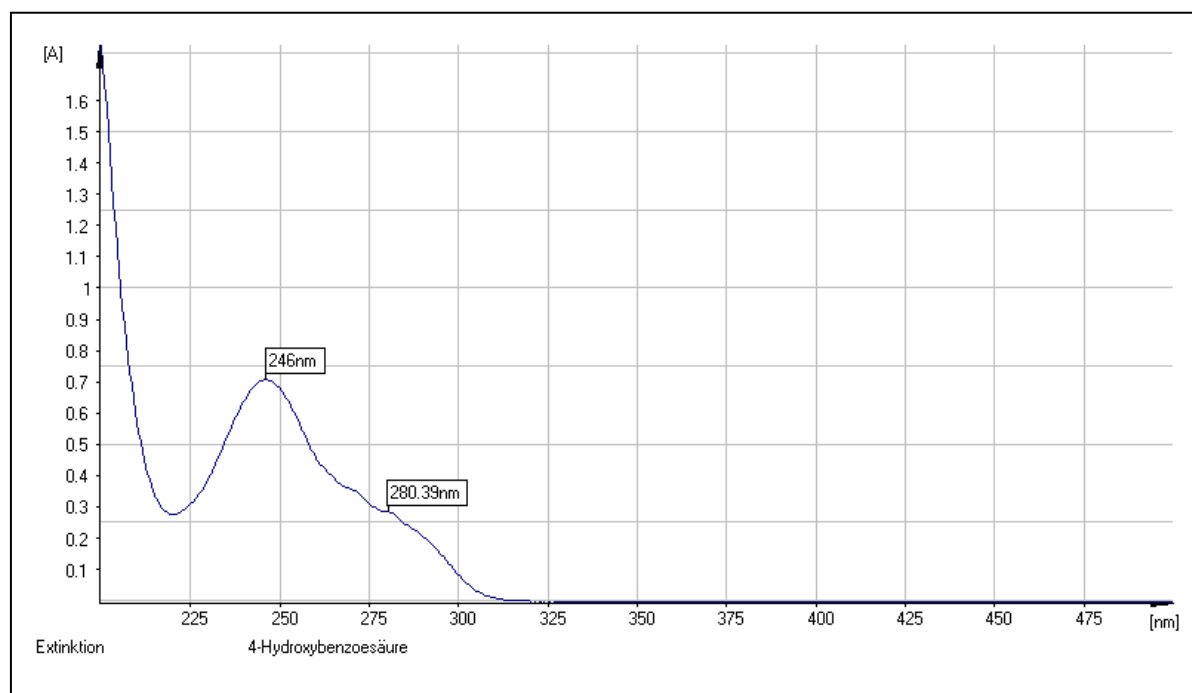
10. Brenzkatechin



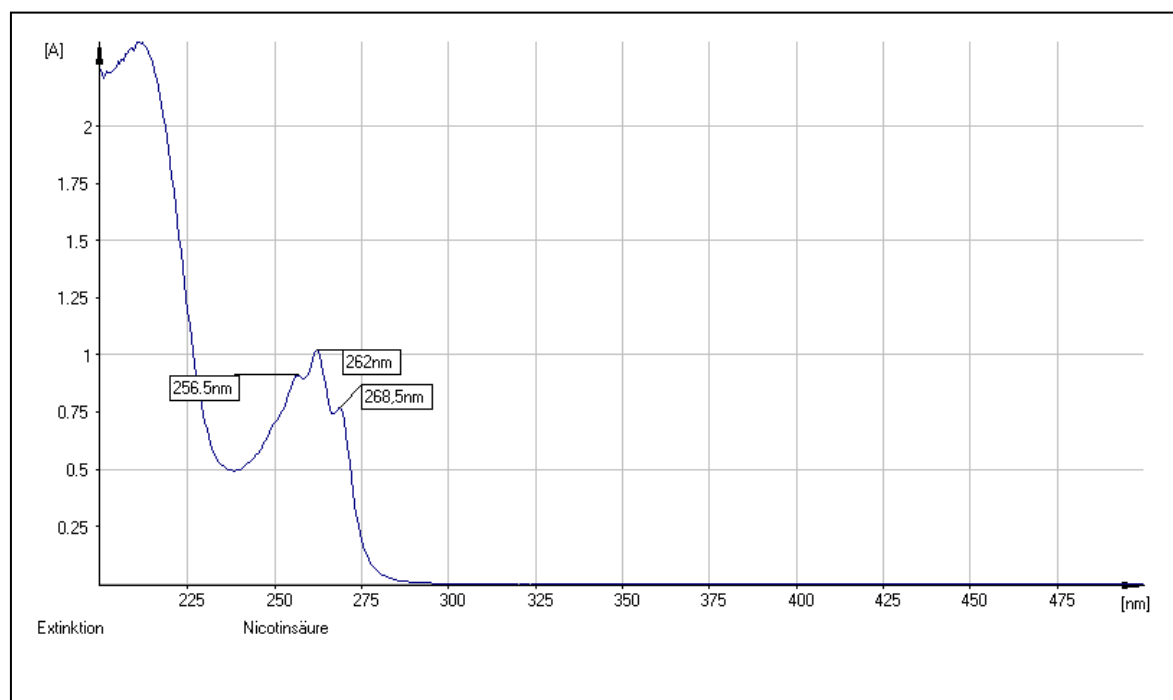
11. 3,5-Dihydroxybenzoesäure



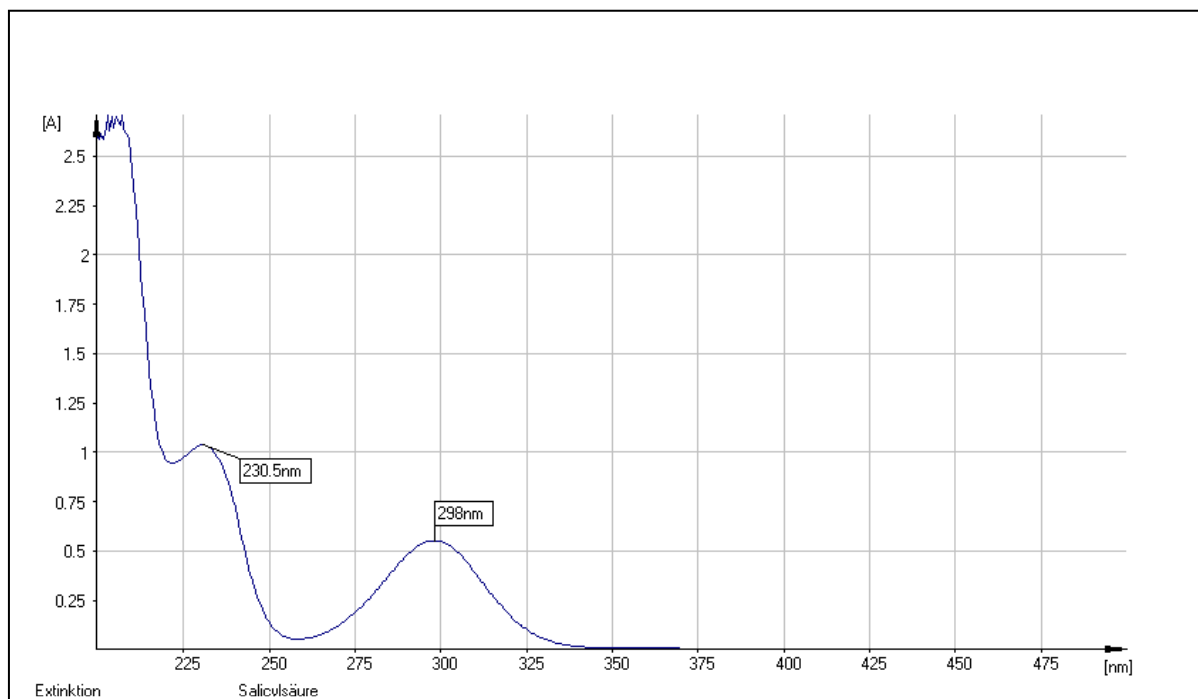
12. 4-Hydroxybenzoesäure



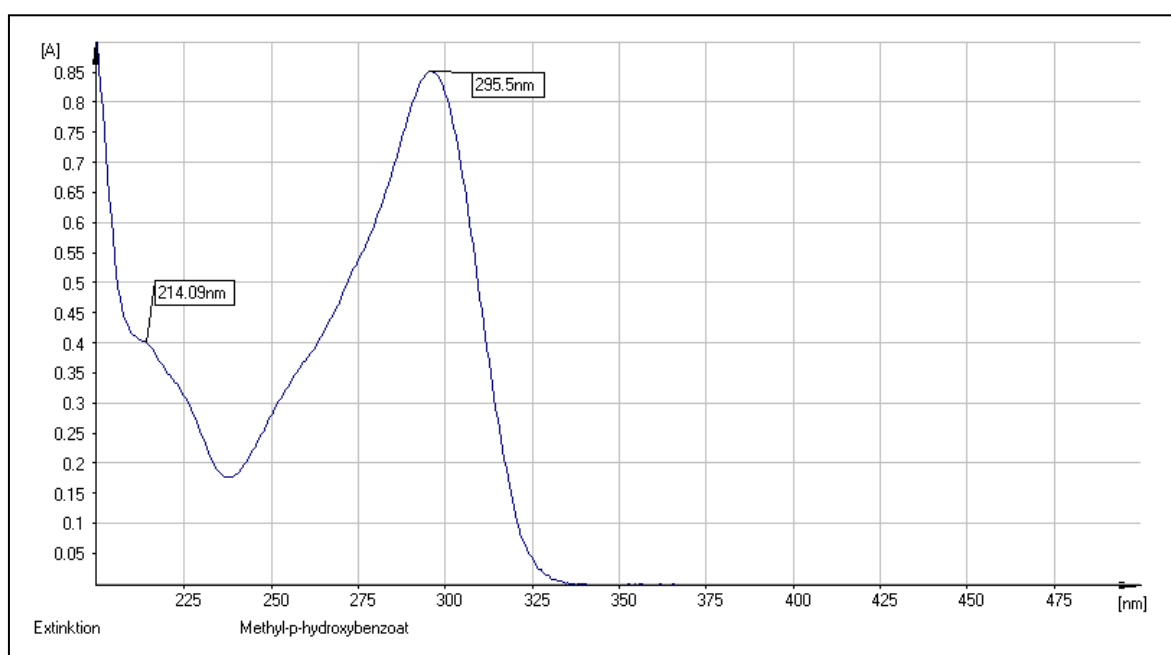
13. Nicotinsäure



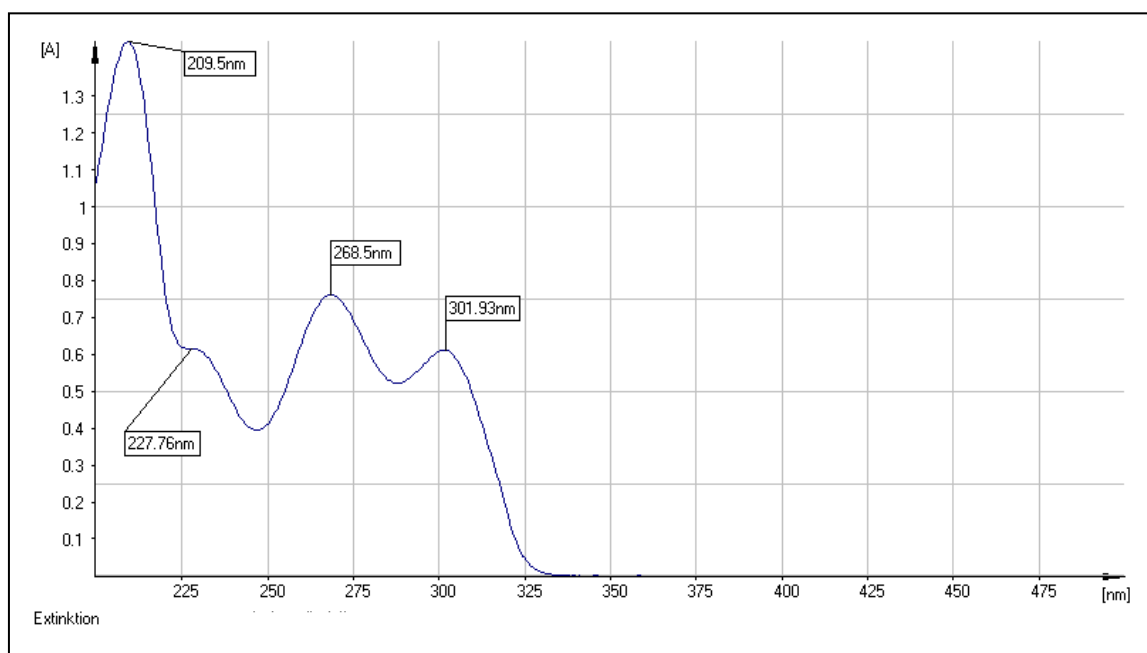
14. Salicylsäure



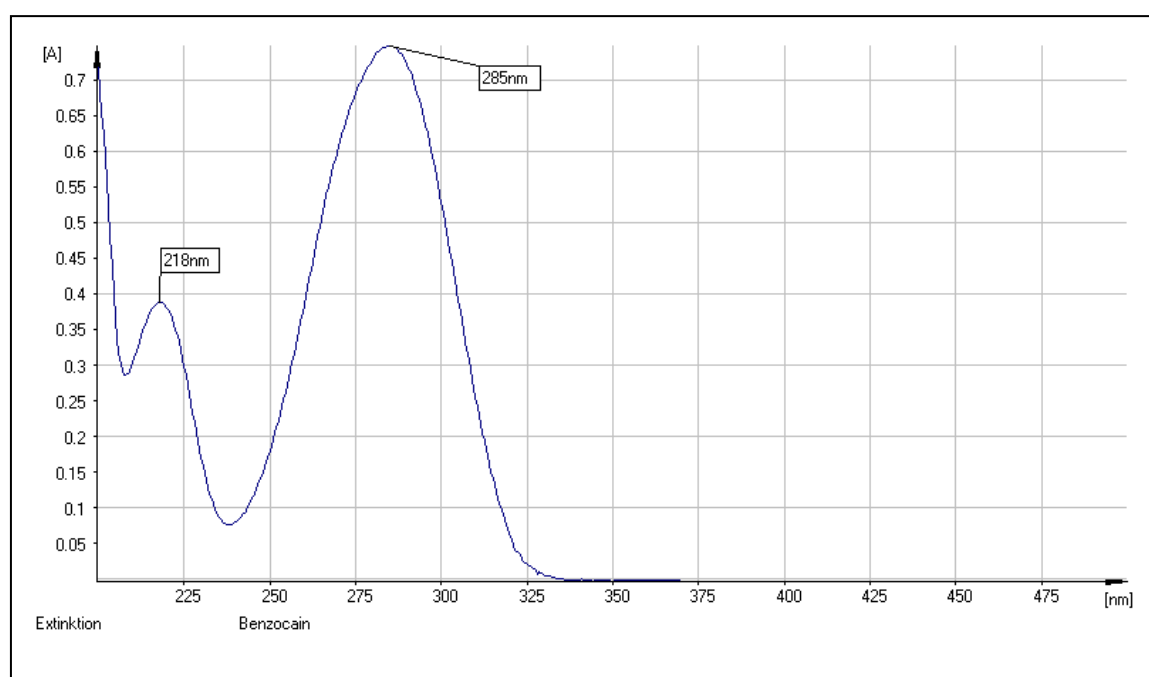
15. p-Hydroxybenzoesäuremethylester



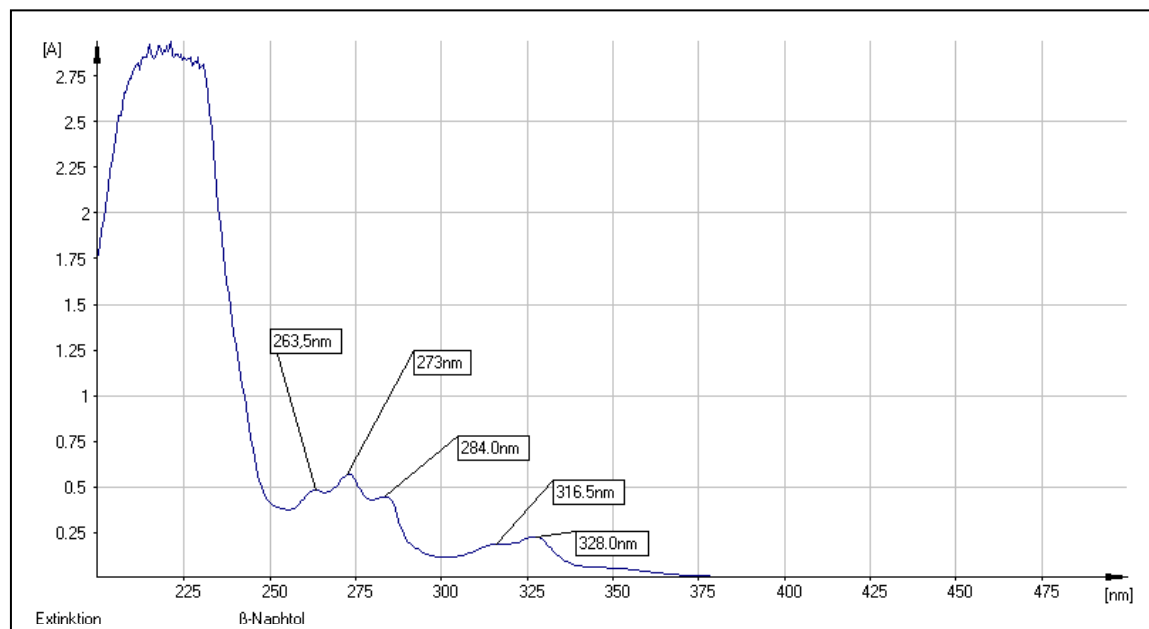
16. Aminobenzoessäure



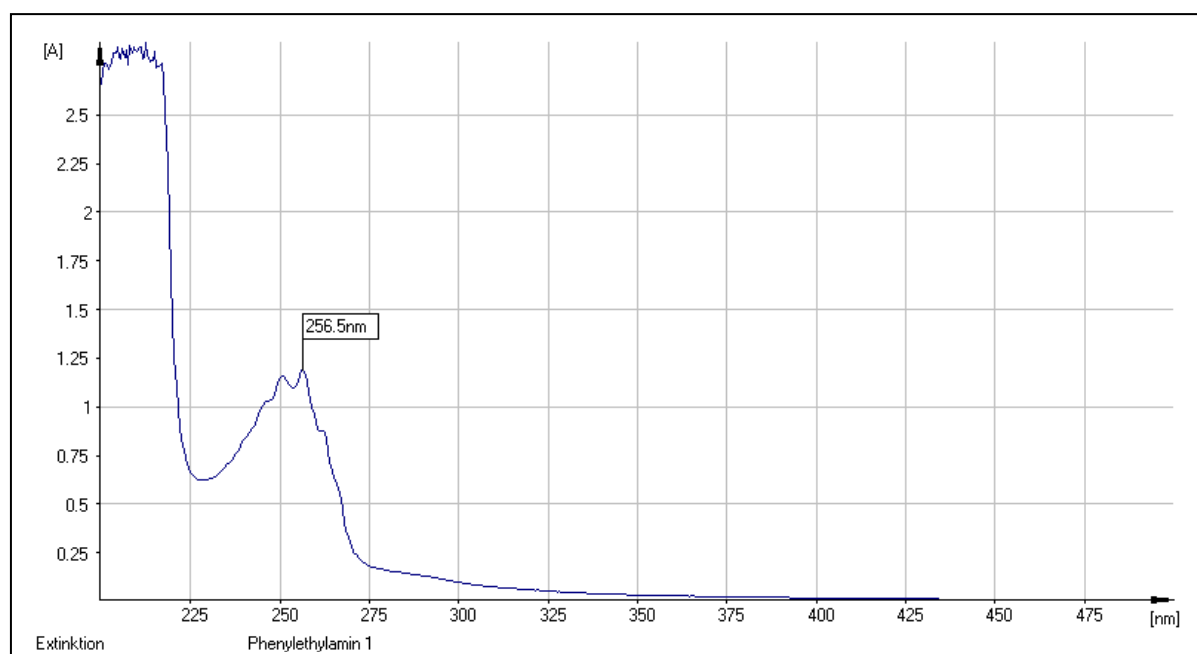
17. Benzocain



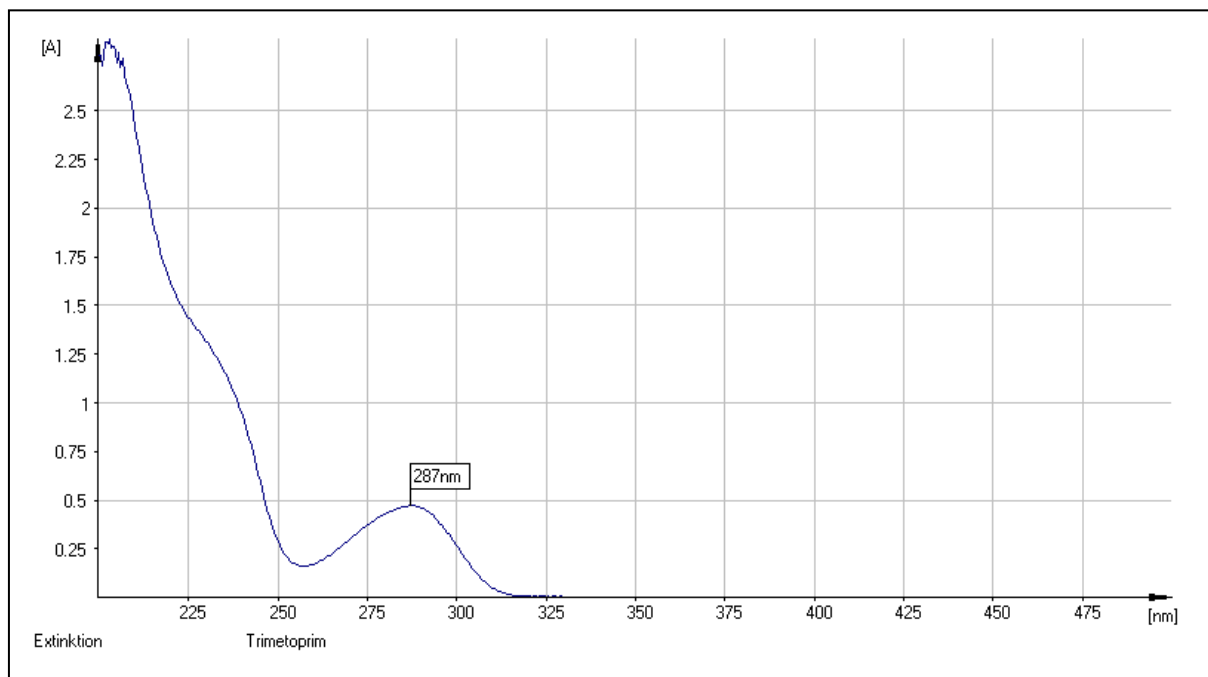
18. 2-Naphtol



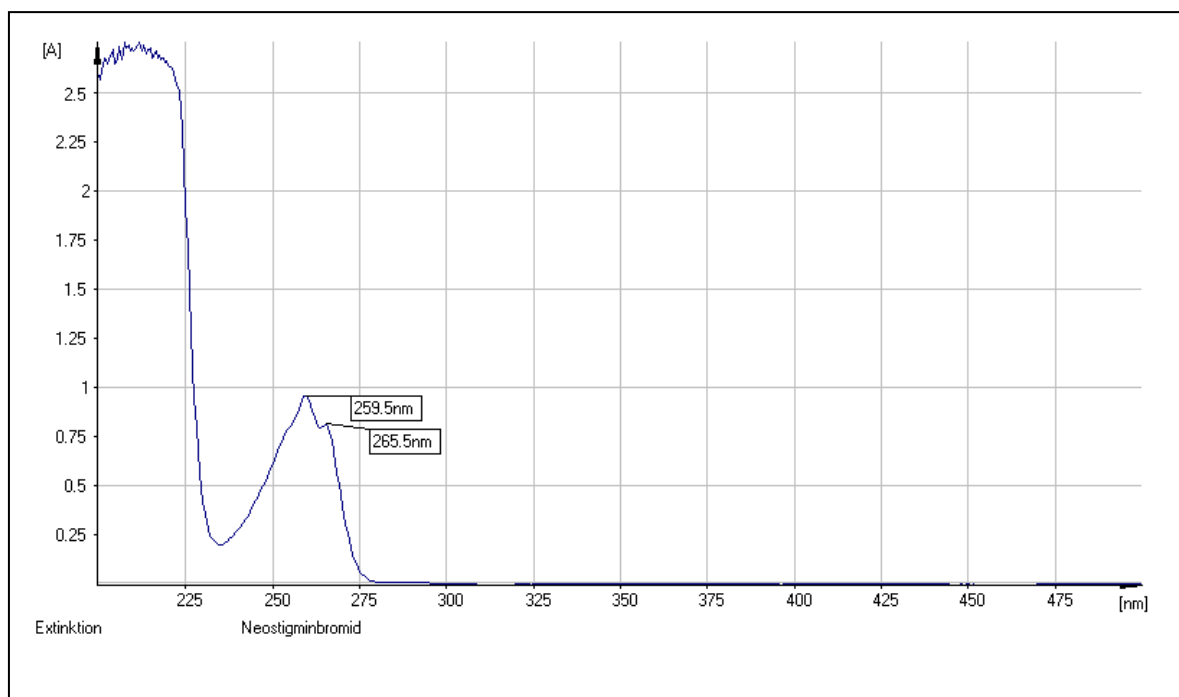
19. Phenylethylamin



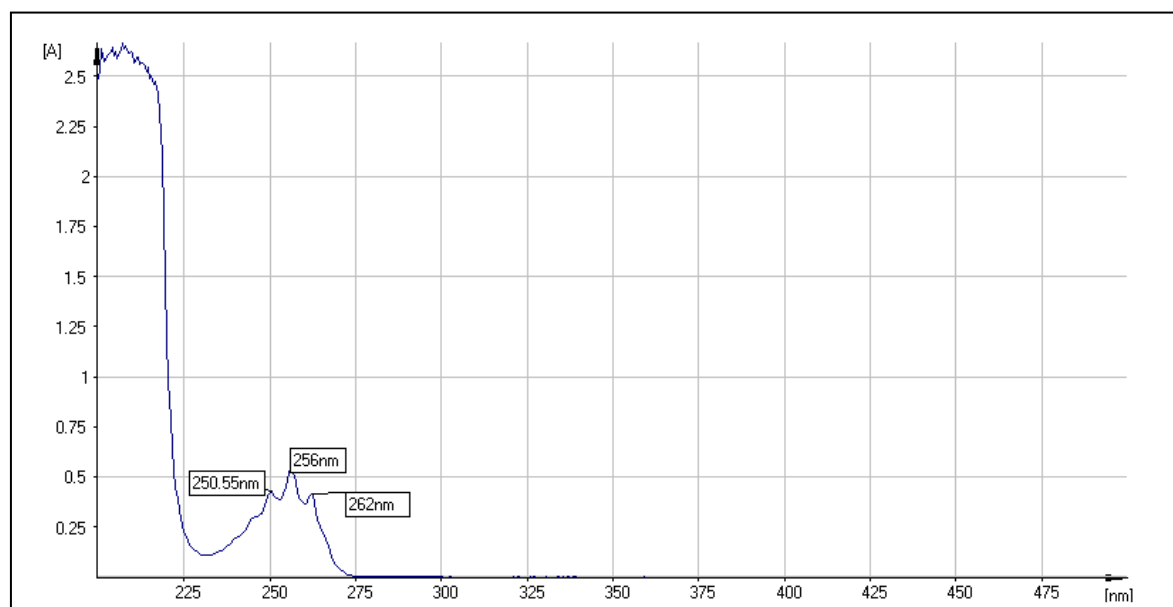
20. Trimethoprim



21. Neostigminbromid



22. Ephedrinhydrochlorid



* UV-Daten aus [104]

10.4 Testplan zur Untersuchung der Stabilität von Cyclodextrinen

Stability Testing of Cyclodextrins (Chiral Selector) - According to the ICH Guideline Q1A (R2) -

(i) Testing frequency

- | | | |
|---------------------|--|-----|
| a) Long term study: | - every 3 month over the first year | (4) |
| | - every 6 month over the second year | (2) |
| | - annually thereafter (3-5) | (3) |
| ----- | | |
| | - Total number | (9) |
| | | |
| b) Accelerated: | - every 3 month; time period: 12 month | (5) |

(ii) Storage conditions

a) Long term study:

- | | | |
|----|----------------------------|-----------------------------|
| 1. | General case: | 25°C + 2°C/60 % RH + 5 % RH |
| 2. | Storage in a refrigerator: | 5°C + 3°C |
| 3. | Storage in a freezer: | - 25°C + 5°C |

b) Accelerated:

- | | | |
|----|----------------------------|---|
| 1. | General case: | 40°C + 2°C/75 % RH + 5 % RH |
| 2. | Storage in a refrigerator: | according to the general case
within the long term study |
| 3. | Storage in a freezer: | --- |

(iii) Specified amount of cyclodextrins

a) Required quantity for analytical methods:

- | | | |
|----|-------------------------|--------|
| 1. | q-NMR (Quantification): | 100 mg |
| 2. | CE (Chiral separation): | 200 mg |

Total amount for one testing point: 300 mg

b) Total number of testing points

1. Long term study:

General case:	9
Storage in a refrigerator:	9
Storage in a freezer:	9

2. Accelerated:

General case:	5

Total number:	32

c) Total amount of cyclodextrins:

32 x 0.300 g = 9.600 g	
+ 10 x 0.300 g = 3.000 g (extra)	

Total amount:	<u>12.600 g</u>

(IV) List of cyclodextrins

a) Native cyclodextrin

1. α -cyclodextrin
2. β -cyclodextrin

b) Derivatized negatively charged cyclodextrin

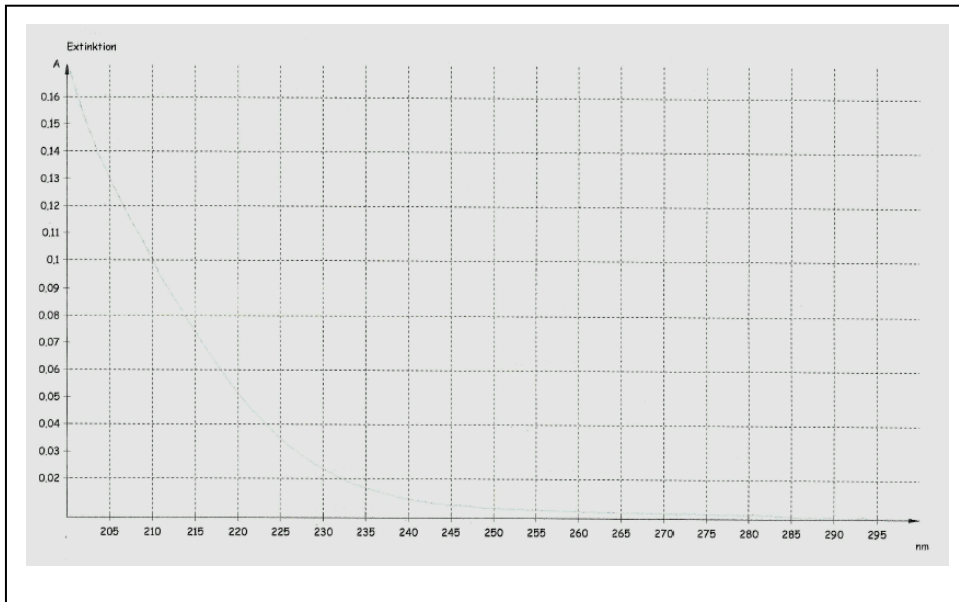
1. HS- α -cyclodextrin
2. HS- β -cyclodextrin
3. HS- γ -cyclodextrin
4. CM- β -cyclodextrin
5. Phosphated- α -cyclodextrin

c) Derivatized positively charged cyclodextrin

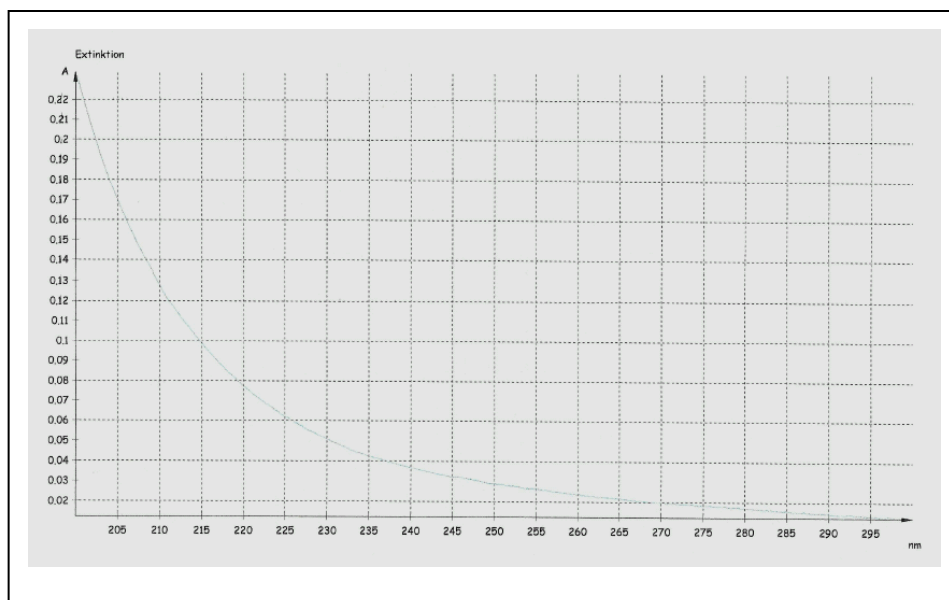
1. Quaternary ammonium cyclodextrin

10.5 UV-Spektren des Trennpuffers ohne und mit SDS-Zusatz (250 mM)

10.5.1 UV-Spektrum 1: Trennpuffer ohne SDS-Zusatz



10.5.2 UV-Spektrum 2: Trennpuffer mit SDS-Zusatz (250mM)



Danksagung

An erste Stelle möchte ich Marieke ter Balk danken für Ihren stets engagierten und motivierten Einsatz als studentische, wissenschaftliche Kraft, mit dem sie mich zu jeder Zeit unterstützt hat!

Meinen herzlichen Dank möchte ich den Wahlpflichtfachstudenten im Arbeitskreis von Professor Dr. H. Wätzig aussprechen, die während meiner Promotion an der Arbeit mitgewirkt haben: Jan Pelzer & Johannes Deppe (WS04/05), Peter Niemeyer & Stefanie Poth (SS05), Konstantin Ölschläger & Jan-Dirk Wieckenberg (WS05/06), Tim Müller-Born & Christian Niehues (SS06), Janine Janssen & Marieke ter Balk (WS06/07)

Ganz herzlich möchte ich Herrn Dr. Hans-Otto Burmeister und Herrn Dr. Lutz Preu für die fachliche und technische Unterstützung und die interessanten Diskussionen danken.

Ich danke den Mitarbeiterinnen der Analytischen Abteilung des Institutes für Pharmazeutische Chemie der TU Braunschweig für die Durchführung der UV-Messungen und die Probenvorbereitung der NMR-Experimente. Für die Aufnahme der FT-NMR-Spektren danke ich Frau P. Holba-Schulz und Frau B. Brinkmann.

Dankbar bin ich allen Mitarbeitern des Institutes für Pharmazeutische Chemie der TU Braunschweig. Insbesondere gilt mein Dank den Mitgliedern und Ehemaligen des Arbeitskreises von Professor Dr. H. Wätzig: Dr. Michael Graf, Dr. Udo Schepers, Dr. Jens Ohnesorge, Matthias Loa, Heidi Köppel, Dr. Simone Schröder, Dr. Sami el Deeb, Tita und Lukas Kaminski. Außer bei Brigitte Babic, Petra Reich, Klaus Hartmann, Matthias Söchtig, Dr. Michael Lorke und Dr. Johann Grünefeld möchte ich mich besonders bei Frank Röse und Dr. Volker Ruthe bedanken, für die freundliche Aufnahme und die ausdauernde Unterstützung! Vielen Dank für die anregenden Diskussionen an die ehemaligen Mitarbeiter Dr. Christian Enge, Dr. Jan Schneider, Dr. Matthias Noreiks, Dr. Björn Gabriel, Dr. Matthias Bode und insbesondere Dr. Christian Prühs und Dr. Hendrik Stukenbrock.

Für die kompetente Begleitung und den gelungenen Einstieg in die Kapillarelektrophorese danke ich den Kollegen aus Münster Dr. Jörg Fabian, Dr. Stefanie Heine und Dr. Niels Janssen.

Für den technischen Support und die fachlichen Anregungen möchte ich mich bei allen Vertretern der Firmen PrinCE Technologies B.V. (Harry!), Polymicro Technologies und Bayer-Schering Pharma (Andreas Krause!) bedanken, sowie bei der NextPharma Arzneimittel GmbH, die beständig die Rahmenbedingungen für meine Arbeit an der TU Braunschweig geschaffen hat.

Ich bedanke mich allen Mitarbeitern und Studierenden des vierten Semesters für das professionelle Arbeiten und den respektvollen Umgang miteinander bei der Durchführung des Praktikums „Instrumentelle Analytik“.

Im Laufe meiner Arbeit habe ich von vielen Menschen Unterstützung und Beistand erfahren, die meine Zeit an, neben und nach der Uni intensiv geprägt haben. An alle, die mir bei weit mehr als nur in fachlichen Fragen zur Seite standen, möchte ich einen besonderen Dank richten, insbesondere an: Dr. Chrille, Nadine, Isa, Sabine, Loa, Silli, Andrea, Matten, die Bramscher Freunde, Christiane, Tanja, Kaddi, Loh, Naddel, die Nummer 1, Fuchsbau associated, Inis, das Dreigestirn, dem Club, den „Hexen“, Stuckimann, Grenzprüfungen, Sögeln – Deutschlands letztes Abenteuer, Christian, Jan-Gerd, Simone, das DPhG-Tagungsteam, Aufschlag, Anna, die Männer-WG Hamburg plus Anhang, Antje, Michel Bayer und die liebe Sophie.

Ganz besonders zählt das für meine Eltern und die gesamte Familie:

Mutter, Vater, Pitty, Jochen, Jan-Hermann, Oma & Große Mutter, die Renslager-Hasemänner und allen anderen auf Hof Kamlage, in Niedersögeln oder wo immer Ihr jetzt seid.

Und an alle die hier keine Erwähnung gefunden haben aber in besonderer Weise am Entstehen dieser Arbeit beteiligt waren!